



Ana João Pinto de Carvalho

Licenciatura em Bioquímica

**Implementação e validação de um
método de pesquisa e quantificação de
Vitamina E por HPLC**

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, Professora
Auxiliar, FCT-UNL

Co-Orientadora: Dra. Sandra Lampreia Silva, Responsável Técnica
do Laboratório de Química, SGS Portugal



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

setembro de 2014



Ana João Pinto de Carvalho

Licenciatura em Bioquímica

**Implementação e validação de um
método de pesquisa e quantificação de
Vitamina E por HPLC**



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

setembro de 2014

“Implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de Vitamina E por HPLC”, Copyright de Ana João Pinto de Carvalho, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para a realização desta dissertação. A todos eles deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

Os meus agradecimentos são dirigidos, em primeiro lugar, à Sociedade Geral de Superintendência – SGS, S.A. pela disponibilização de todos os meios técnicos, sem os quais não teria sido possível a realização desta dissertação. Agradeço à Engenheira Ana Machado por me ter recebido gentilmente no Laboratório da SGS e ter possibilitado a realização deste trabalho.

À Professora Benilde Mendes, Professora Coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar da FCT-UNL, agradeço a dedicação e constante preocupação pelo interesse dos alunos.

À Professora Ana Lúcia Leitão, agradeço fortemente a motivação, a confiança e a paciência que sempre me concedeu, os valiosos conselhos e o permanente estímulo que se tornaram decisivos em determinados momentos. Agradeço a partilha de conhecimentos que foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação, bem como toda a disponibilidade demonstrada.

À Sandra Silva, responsável pelo laboratório de Química da SGS agradeço o entusiasmo, dedicação, partilha de conhecimento e de experiência científica, necessários à realização desta dissertação.

Quero também deixar uma palavra de agradecimento a todos os professores que acompanharam o meu percurso na FCT, em especial aos professores do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, pela dedicação aos alunos e pela forma como lecionam e transmitem o interesse pelas suas matérias.

A todos aqueles que trabalharam comigo no Laboratório da SGS, especialmente os técnicos Alice, Rita, Mauro, Lourdes e Armandina agradeço os valiosos conhecimentos transmitidos, o apoio dispensado e a constante preocupação e a todos os colegas estagiários com quem tive o gosto de trabalhar e conviver, Fábio, Jaciara, João, Tanya, Tiziana, Fátima, Rosa e Andreia, um agradecimento especial pela amizade, alegria e carinho transmitidos.

À Mónia, Beatriz, Marta, Catarina, Alexandra e Diogo pelo companheirismo e pelas valiosas tardes de partilha de conhecimentos e de alegrias. Os sucessos alcançados nesta etapa devem-se, também, a vocês.

Às minhas companheiras de estágio Liliana, Tatiana e Andreia, agradeço os momentos compartilhados, a convivência, a amizade, o apoio e incentivo permanentes. À Liliana um reconhecimento especial pela constante motivação e confiança, pelos conselhos e pela ajuda. Obrigada por terem feito parte desta etapa tão importante na minha vida.

Às minhas raposas, por todos os momentos que compartilhamos, pela amizade, alegria e boa disposição constantes e pelas memórias de momentos fantásticos que guardo com carinho. E à família CDESMT agradeço o carinho com que me acolheram e o constante incentivo de alcançar mais e de ser melhor.

A todos os meus amigos que de uma maneira ou de outra, estando longe ou perto, me apoiaram ao longo da realização deste trabalho e em especial aos melhores amigos que se pode ter Diana, Rita e Mário.

Ao Miguel, um agradecimento especial e sentido, pela amizade, amor e apoio incondicionais que sempre me incentivaram a fazer mais e a ir mais longe. Agradeço a partilha de conhecimentos, a compreensão e a constante presença ao longo dos anos.

E aos mais importantes e a quem devo muito, os pais, a mana e restante família, um agradecimento gigante por tudo o que fizeram por mim, pelo incessante apoio, carinho, força e incentivo permanentes, imprescindíveis e fundamentais na motivação, realização e conclusão deste trabalho. Obrigada por serem uma ótima e inesgotável fonte de sorrisos.

“Só aqueles que se arriscam a ir demasiado longe podem descobrir quão longe podem chegar.”

Obrigada a todos.

RESUMO

As vitaminas são substâncias orgânicas presentes em muitos alimentos, em pequenas quantidades e indispensáveis ao funcionamento do organismo. A ausência sistemática destas resulta, quase sempre, em crescimento e desenvolvimento deficientes e em casos extremos pode conduzir a doenças graves, como por exemplo, a demência (vitaminas do complexo B), o raquitismo (vitamina D), o escorbuto (vitamina C).

Em 1968 a *American Food and Nutrition Board* reconheceu oficialmente a vitamina E como um nutriente essencial para os seres humanos, pois possui uma importante função no organismo, como antioxidante, ao inibir a oxidação de lípidos insaturados e ao prevenir o dano oxidativo celular pela inativação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. O interesse nesta vitamina é cada vez maior, devido às funções que desempenha no organismo como agente antioxidante, envolvido no retardamento do envelhecimento e na proteção de doenças crônicas não transmissíveis, como *Parkinson*, *Alzheimer*, cancro e doenças cardiovasculares.

O presente trabalho tem como objetivo a implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação da vitamina E na manteiga por cromatografia líquida de alta eficiência, no laboratório de Química da empresa SGS, expandindo desta forma, as capacidades da empresa nesta área. Para tal foram avaliados parâmetros como linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

Os resultados mostram que o método é linear para uma gama de trabalho entre 5,00 e 50,00 mg/L com um limite de detecção e quantificação de 1,27 mg/L e 3,84 mg/L, respetivamente. O método apresentou repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, com coeficientes de variação inferiores a 5%, limite de repetibilidade de 1,37 mg/kg e variabilidade de resultados associados ao método de 0,19 mg/L. A exatidão do método foi aferida recorrendo a ensaios de recuperação, tendo-se obtido percentagens de recuperação médias superiores a 80%.

Palavras-chave: Vitamina E, Implementação, Validação, Quantificação, HPLC, Manteiga

ABSTRACT

Vitamins are organic compounds present in many foods in small amounts being essential to the normal body function. Their systematic absence frequently result in deficient growth and development and in extreme cases can lead to serious diseases such as dementia (vitamin complex B), rickets (vitamin D), scurvy (vitamin C).

In 1968 the American Food and Nutrition Board officially recognized the vitamin E as an essential nutrient for humans, because it has an important function in the body as an antioxidant inhibiting oxidation of unsaturated lipids and preventing cellular oxidative damage by inactivating free radicals and reactive oxygen species. The interest in this vitamin is increasing due to its health benefits involving the slowing the aging and protection of non-transmissible chronic diseases, such as Parkinson's, Alzheimer's, cancer and cardiovascular diseases.

The aims of this work are the implementation and validation of an analytical methodology of screening and quantification of vitamin E in the butter, by high performance liquid chromatography in the chemistry laboratory of SGS, thereby, expanding the company's in this field. The parameters such as linearity, limits of detection and quantification, repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated.

The results show linearity in a range of concentrations from 5.00 and 50.00 mg/L with a limit of detection and quantification of 1.27 mg/L and 3.84 mg/L, respectively. The method also show acceptable intermediate precision and repeatability, with coefficients of variation lower than 5%, repeatability limit of 1.37 mg/kg and variability of results associated with the method of 0.19 mg/L. The method accuracy was checked with recovery assays, giving mean recovery rates higher than 80%.

Keywords: Vitamin E, Implementation, Validation, Quantification, HPLC, Butter

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XVII
1. OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Estrutura	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 As vitaminas.....	3
2.1.1 Funções no organismo e fontes alimentares.....	4
2.1.2 A descoberta das vitaminas.....	7
2.2 Os antioxidantes	8
2.2.1 Oxidação de ácidos gordos insaturados.....	10
2.2.2 As classificações dos antioxidantes.....	11
2.2.3 Os antioxidantes nos alimentos	14
2.2.4 O envelhecimento celular	15
2.3 Os tocoferóis.....	16
2.3.1 Química do tocoferol e do tocotrienol	17
2.3.2 Absorção, transporte e excreção	20
2.3.3 Mecanismos de ação	25
2.4 Radicais livres na Doença de Alzheimer	27

2.5 Métodos cromatográficos	29
2.6 Extração e quantificação de vitamina E	35
3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA	41
3.1 SGS – Sociedade Geral de Superintendência, S.A.	41
4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.1 Introdução	43
4.2 Reagentes.....	43
4.3 Material	44
4.4 Equipamento.....	44
4.5 Preparação de Soluções	44
4.6 Estudos preliminares	45
4.7 Procedimento experimental a validar	51
5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	53
5.1 Curva de calibração	54
5.1.1 Gama de trabalho	56
5.1.2 Linearidade	59
5.2 Limiares analíticos	60
5.3 Precisão	62
5.3.1 Repetibilidade	63
5.3.2 Precisão intermédia	66
5.4 Exatidão	68
6. CONCLUSÃO	71
7. BIBLIOGRAFIA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Formação de radicais livres a partir do oxigénio molecular.....	8
Figura 2.2 Mecanismo de autooxidação de ácidos gordos insaturados (Adaptado de: Shahidi & Wanasundara, 2002).....	10
Figura 2.3 Mecanismo de ação de antioxidantes primários. Onde: ROO [*] e R [*] - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogénio ativo; A [*] - radical inerte (Frankel, 1980; Reische <i>et al.</i> , 2002; Ramalho & Jorge, 2006)	11
Figura 2.4 Estrutura química geral dos dois grupos de compostos da vitamina E (Adaptado de: Azzi & Stocker, 2000).....	17
Figura 2.5 Lipoproteínas e transporte de lípidos (Adaptado de: Nelson & Cox, 2005).....	21
Figura 2.6 Modelo esquemático da lipoproteína de baixa densidade (Adaptado de: Berg <i>et al.</i> , 2008).	22
Figura 2.7 Estrutura química dos metabolitos: α -tocoferil quinona e α -tocoferil hidroquinona (Adaptado de: Brigelius-Flohé & Traber, 1999).	23
Figura 2.8 Estrutura química dos metabolitos: ácido α -tocoferónico e α -tocoferonolactona (Adaptado de: Christie, 2014).	23
Figura 2.9 Estrutura química do metabolito urinário α -CEHC conjugado com ácido glucorónico e conjugado com sulfato (Adaptado de: Sharma <i>et al.</i> , 2013).....	24
Figura 2.10 Esquematização da regeneração do tocoferol (Adaptado de Aditivos e Ingredientes, 2010).	25
Figura 2.11 Diferentes métodos cromatográficos.	30
Figura 2.12 Aparelho de HPLC da marca Agilent Technologies (Fonte: Agilent Technologies, 2013)	33
Figura 3.1 Logotipo de slogan da empresa SGS, S.A.	41
Figura 5.1 Cromatograma obtido para a solução padrão de 5,00 mg/L.	54
Figura 5.2 Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra sem fortificação e amostra com fortificação de 5,00 mg/L.	55
Figura 5.3 Representação gráfica referente à curva de calibração de vitamina E com padrões entre os 5,00 mg/L e os 50,00 mg/L.	56
Figura 5.4 Teste RIKILT para avaliar a linearidade.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Principais funções bem como problemas desenvolvidos pela carência ou excesso destas vitaminas (Meydani, 2000; Brigelius-Flohé <i>et al.</i> , 2002; Bianchini & Penteado, 2003; Pinto, 2007; Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011; Alvarenga, 2013).....	4
Tabela 2.2 Principais fontes alimentares das vitaminas A, B, C, D, E e K (Paiva & Russell, 1999; INSA, 2007; Costa, 2008; Talvas <i>et al.</i> , 2010; Nimalaratne <i>et al.</i> , 2011).	6
Tabela 2.3 Alguns constituintes dos grupos de antioxidantes naturais, enzimáticos e sintéticos (Sies, 1993; Bianchi & Antunes, 1999; Reische <i>et al.</i> , 2002; Food Ingredients Brasil, 2009).	12
Tabela 2.4 Atividade biológica dos tocoferóis naturais, tocotrienóis e estereoisômeros sintéticos do α -tocoferil acetato (Weiser & Vecchi, 1982; Weimann & Weiser, 1991; Weiser <i>et al.</i> , 1996; Azzi & Stocker, 2000).....	19
Tabela 4.1 Concentração da Vitamina E expressa em mg/L e mg/100g, correspondente aos primeiros ensaios realizados e respectivas percentagem de recuperação.	47
Tabela 4.2 Novos ensaios efetuados com pequenas alterações no procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação	48
Tabela 4.3 Ensaios efetuados com a alteração do solvente e com outras pequenas alterações no procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação.....	50
Tabela 4.4 Ensaio de confirmação do novo procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação.....	51
Tabela 5.1 Sinal cromatográfico referente à concentração dos padrões.	55
Tabela 5.2 Área dos picos cromatográficos referentes aos padrões 5,00 mg/L e 50,00 mg/L, bem como médias, desvios padrões, variâncias e valores experimentais de PG.	58
Tabela 5.3 Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental. Cálculo das razões entre estes, bem como o seu valor médio e a percentagem de linearidade.....	59
Tabela 5.4 Valores dos limiares analíticos calculados.	61
Tabela 5.5 Área dos picos cromatográficos e a respetiva concentração (expresso em mg/kg) para o estudo da repetibilidade.	64

Tabela 5.6 Diferença absoluta entre dois resultados dos ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para a área do pico cromatográfico. O limite de repetibilidade calculado tem o valor de 1,51..... 65

Tabela 5.7 Diferença absoluta entre dois resultados dos ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para a concentração, expressa em mg/kg. O limite de repetibilidade calculado tem o valor de 1,37..... 65

Tabela 5.8 Área dos picos cromatográficos e a respetiva concentração (expresso em mg/L) para o estudo da precisão intermédia. 67

Tabela 5.9 Valores de recuperação obtidos para a fortificação com o padrão de 5,00 mg/L. 69

Tabela 5.10 Valores de recuperação obtidos para a fortificação com o padrão de 40,00 mg/L. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A[•]	Radical inerte
AH	Antioxidante com um átomo de hidrogénio ativo
ATP	Adenosina 5-fosfato
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CAT	Catalase
CDMDHC	Carboxidimetildecilhidroxicromano
CDMOHC	Carboxidimetiloctilhidroxicromano
CMBHC	Carboximethylbutilhidroxicromano
CMHHC	Carboximethylhexilhidroxicromano
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GPx	Glutathione peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia gasosa de alta eficiência
IDL	Lipoproteína de densidade intermédia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PG	Propil galato

PKC	Proteína cinase C
R[•]	Radical livre
RH	Ácido gordo insaturado
RNA	Ácido ribonucleico
ROO[•]	Radical livre
ROOR	Molécula não radicalar estável
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SGS	Sociedade Geral de Superintendência
SOD	Superóxido dismutase
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>
α-CEHC	2,5,7,8-tetrametil-2-(2'-carboxietil)-6-hidroxicromano
α-TTP	Proteína α-tocoferol transferase

1. OBJECTIVO E ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

1.1 Enquadramento

As vitaminas são classificadas como elementos essenciais à saúde dos seres humanos e ao adequado funcionamento do seu organismo e diferem entre si quanto à sua estrutura química e respectivas funções (Pereira, 2011).

A vitamina E é um termo geral usado para designar oito compostos lipossolúveis, que se dividem em dois grupos, os tocoferóis e os tocotrienóis (Batista *et al.*, 2007). Pertence ao grupo de vitaminas lipossolúveis e como tal, segue o metabolismo lipídico, ou seja, tal como estes, está dependente da ação de sais biliares, formação de micelas e incorporação em quilomicras nos enterócitos. O tocoferol livre é, então, transportado no organismo como componente de lipoproteínas plasmáticas, sendo rapidamente distribuído pelos tecidos (Wang & Quinn, 1999; Mourão *et al.*, 2005). Esta possui uma importante função no organismo, como antioxidante, que inibe a oxidação de lípidos insaturados e previne o dano oxidativo celular pela inativação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Ramalho & Jorge, 2006; Batista *et al.*, 2007).

Em 1968 a *American Food and Nutrition Board* reconheceu oficialmente a vitamina E como um nutriente essencial para os seres humanos (Azzi & Stocker, 2000). A atenção dos cientistas está cada vez mais, centrada nesta vitamina. O tocoferol, poderoso antioxidante, está envolvido no retardamento do envelhecimento e na proteção de doenças crônicas não transmissíveis, como *Parkinson*, *Alzheimer*, cancro e doenças cardiovasculares (Batista *et al.*, 2007).

A alimentação é o conjunto de hábitos e substâncias que o Homem utiliza, de modo a assegurar as suas funções vitais, como elemento da sua cultura para manter e melhorar a sua saúde. A qualidade alimentar é definida pelas características do produto que promovem a satisfação do consumidor e abrange propriedades sensoriais, valores nutricionais, constituintes químicos, propriedades mecânicas, propriedades funcionais e segurança. Podem ser utilizados vários parâmetros, através de métodos sensoriais e instrumentais, para determinar a qualidade dos produtos. Os instrumentos fornecem medidas quantitativas de atributos relacionados com a qualidade, que são vitais para a investigação e fiscalização (Almenar *et al.*, 2010). Muitas vezes o consumidor é ludibriado com a ideia de que as características organoléticas são sinónimos de um alimento rico em termos nutricionais, o que nem sempre corresponde à realidade. Assim, o conhecimento da qualidade em termos analíticos é fundamental para a melhoria dos hábitos alimentares através da produção de alimentos mais ricos em termos nutricionais (Bouhlal *et al.*, 2011).

A SGS Portugal possui laboratórios acreditados nas áreas agroalimentar, ambiental, detergentes e produtos de higiene, cosméticos, entre outros e os serviços hoje em dia prestados abrangem análises, ensaios, inspeções e auditorias técnicas nos mais diversos ramos. Desta forma a SGS oferece soluções que asseguram que os produtos cumprem os padrões internacionais e que cheguem com segurança à mesa do consumidor.

Fazendo face às necessidades do mercado, mais especificamente da empresa SGS, o presente trabalho teve como objetivo a implementação e validação de uma metodologia analítica para a determinação da vitamina E, por cromatografia líquida de alta eficiência. Com este método, a empresa SGS Portugal, ganha independência e a autonomia necessárias para realizar as próprias determinações, sem recorrer a subcontratações.

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo desta forma, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Assim, torna-se fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida que lhes é exigida. Tendo em conta que o método a validar é uma técnica de ensaio conhecida, descrita em literatura científica, os parâmetros mínimos a considerar são a curva de calibração (gama de trabalho e linearidade), os limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), a precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e a exatidão (Relacre, 2000).

1.2 Estrutura

No capítulo 1 faz-se o enquadramento lógico do trabalho e a estrutura do mesmo. Durante o capítulo 2 é desenvolvida toda a revisão bibliográfica, que é iniciada com as funções e fontes alimentares das vitaminas e a sua descoberta. Os radicais livres, o envelhecimento celular e suas consequências, bem como a defesa do organismo e os principais antioxidantes, são os temas inicialmente descritos. Sobre a vitamina E é abordada a química do tocoferol e tocotrienol, bem como a absorção, transporte, excreção e mecanismo de ação. Posteriormente é realizada uma revisão sobre os radicais livres na doença de *Alzheimer*. Neste capítulo também serão abordados os fundamentos teóricos dos métodos cromatográficos e os processos de extração e quantificação de vitamina E. O capítulo 3 caracteriza a empresa Sociedade Geral de Superintendência. No capítulo 4 é descrito todo o desenvolvimento experimental que permitiu a posterior validação do método, reagentes, soluções, padrões, material e equipamentos. No capítulo 5 é apresentado o desenvolvimento da validação do método e no capítulo 6 são tiradas as principais conclusões acerca do trabalho desenvolvido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As vitaminas

A alimentação é o conjunto de hábitos que o Homem utiliza, para manter e melhorar a sua saúde. É, geralmente, um ato voluntário e consciente e totalmente dependente da vontade do indivíduo, sendo que a ingestão deve ser adequada de forma a satisfazer as necessidades metabólicas individuais.

O equilíbrio nutricional é essencial para manter um estado de saúde equilibrado, em qualquer idade. Para que aconteça é necessária uma ingestão moderada tanto de macronutrientes como de micronutrientes. Para o bom funcionamento do organismo humano e em prol da defesa contra infeções é necessário ingerir pequenas quantidades de micronutrientes, nomeadamente as vitaminas, visto que o organismo humano não é capaz de as sintetizar. Estas são uma classe de substâncias orgânicas complexas, fundamentais na manutenção das funções vitais do organismo e encontram-se em reduzidas quantidades e em variadas concentrações nos alimentos (Pinto, 2007).

Embora o organismo necessite de quantidades diárias mínimas destas substâncias, o aparecimento dos sintomas de défice são precoces para algumas, podendo aparecer ao fim de 3 dias a 4 semanas. A carência de vitaminas pode ser intitulada de avitaminose e o seu défice prolongado é o mais preocupante, pois pode conduzir a doenças graves, como por exemplo, a demência (vitaminas do complexo B), o raquitismo (vitamina D), o escorbuto (vitamina C) e em casos extremos pode mesmo levar à morte. Todavia, existem situações particulares em que o seu défice se pode instalar, de modo insidioso, conduzindo a quadros clínicos que nem sempre são fáceis de identificar. É o caso de indivíduos que se encontram em tratamento com determinados medicamentos que amplificam as necessidades vitamínicas, de pessoas em estados de desnutrição e subnutrição, de indivíduos portadores de certas doenças, particularmente o alcoolismo e também de pessoas idosas com padrões alimentares monótonos (Pinto, 2007).

As vitaminas, classificadas como elementos essenciais à saúde dos seres humanos, diferem na estrutura química e nas respetivas funções que desempenham no organismo. Assim, dividem-se em dois grupos principais: hidro e lipossolúveis (Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011).

As lipossolúveis são nomeadamente a A, D, E e K e as hidrossolúveis são as do complexo B e a C. As vitaminas C e do complexo B são hidrossolúveis e predominam em alimentos não gordurosos e ricos em água, como as frutas e os vegetais. Estas são facilmente eliminadas pelo organismo, daí que as situações de excesso sejam pouco frequentes. No

entanto, também significa que a sua estabilidade química é menor e que não são armazenadas no organismo com facilidade, necessitando de uma reposição constante (Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011).

As vitaminas hidrossolúveis (com exceção da C) têm atividade catalítica e como tal, atuam como coenzimas que se ligam a proteínas, ativando os centros enzimáticos e catalisando reações necessárias ao bom funcionamento do organismo. Já as lipossolúveis predominam em alimentos ricos em lípidos, possuindo uma estrutura química semelhante a alguns lípidos (esteroides), sendo armazenadas pelo organismo com relativa facilidade, no entanto a sua eliminação é um pouco mais complexa. Na dieta alimentar não se ingere, muitas das vezes, a vitamina mas sim uma pró-vitamina, que é uma substância com estrutura semelhante à sua vitamina específica correspondente, podendo ser um precursor da mesma, sendo posteriormente sintetizada na sua estrutura final. A título de exemplo, os carotenos que também são denominados de pró-vitamina A (Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011).

2.1.1 Funções no organismo e fontes alimentares

Todos os seres vivos dependem da correta assimilação dos nutrientes que ingerem, assim como da adequada eliminação dos seus resíduos. Através dos alimentos, podemos fornecer ao nosso organismo, os nutrientes que ele necessita e ao mesmo tempo proporcionar tudo o que é necessário para garantir o seu bom funcionamento.

Na tabela 2.1 são mencionadas as principais funções bem como os problemas desenvolvidos pela sua carência e em alguns casos, pelo seu excesso. Na tabela 2.2 é possível encontrar as principais fontes alimentares destas vitaminas.

Tabela 2.1 Principais funções bem como problemas desenvolvidos pela carência ou excesso destas vitaminas (Meydani, 2000; Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Bianchini & Penteado, 2003; Pinto, 2007; Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011; Alvarenga, 2013).

Vitamina	Função	Carência/Excesso
A (β -caroteno ou pró-vitamina A)	Essencial para a função imunitária, regulação do crescimento celular, boa formação da pele, das mucosas, dos ossos e dos dentes. Produz os pigmentos necessários ao funcionamento da retina, o que facilita a visão especialmente durante a noite.	A carência provoca problemas de visão (especialmente a cegueira noturna), problemas cutâneos (secura, descamação, queratinização), alteração da função imunitária e em casos extremos pode levar à morte. O excesso causa náusea, vômitos, perda de apetite, anorexia, dor de cabeça extrema, coma e morte.

Tabela 2.1 (Continuação) Principais funções bem como problemas desenvolvidos pela carência ou excesso destas vitaminas (Meydani, 2000; Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Bianchini & Penteado, 2003; Pinto, 2007; Lidon & Silvestre, 2010; Pereira, 2011; Alvarenga, 2013)

Vitamina	Função	Carência/Excesso
B (complexo vitamínico: B1 tiamina, B2 riboflavina, B3 nicotinamida, B5 ácido pantoténico, B6 piridoxina, B8 biotina B9 ácido fólico e B12 cianocobalamina)	Atua sobre o sistema nervoso, na renovação das células e produção de hemácias, assim como no funcionamento da tireoide e do aparelho reprodutor. As coenzimas da vitamina B atuam em sistemas enzimáticos de transferência de certos grupos entre moléculas, podendo sintetizar, proteínas, lípidos ou glúcidos.	A carência provoca o beribéri, anemia, problemas no sistema nervoso, distúrbios de crescimento, confusão mental, suores noturnos e insónias, fraqueza muscular, ansiedade, agitação, indigestão, redução de memória e sonolência.
C (ácido ascórbico)	Essencial para a síntese do colagénio, para o cérebro e sistema nervoso, metabolismo dos nutrientes absorção do ferro e síntese de ácidos biliares. Poderoso antioxidante, usado para transformar os radicais livres de oxigénio em formas de menor reatividade química e quando usada com outros antioxidantes tem efeitos potencializados.	A carência prolongada causa o escorbuto (sangramento subcutâneo, fraqueza muscular, lesões nas gengivas e perturbações ósseas), diminuição da função imunitária, aumento do risco de doenças do coração e de cancro. O excesso pode causar irritação do estômago e intestinos e contribuir para a formação de pedras nos rins.
D (vitamina da luz solar. 10 compostos diferentes mas apenas 2 são considerados importantes: D2 ergocalciferol, D3 colecalciferol)	Promove a absorção de cálcio, essencial para o desenvolvimento e manutenção da saúde dos ossos e dentes e promove também a manutenção dos níveis sanguíneos de cálcio e fósforo.	A deficiência manifesta-se nas crianças pelo raquitismo, nos adultos pela osteomalacia e nos idosos pode contribuir para o aparecimento da osteoporose. O excesso pode levar à hipercalcemia e calcificação nos tecidos moles, coma e morte (casos extremos).
E (designação genérica de oito compostos lipossolúveis, que se dividem em 2 grupos os tocoferóis e tocotrienóis)	Poderoso antioxidante que está ligado à redução das lesões causadas pelos radicais livres e espécies reativas de oxigénio. Protege os ácidos gordos polinsaturados da lipoperoxidação e contribui para a manutenção da integridade das membranas plasmáticas, dos organitos e das lipoproteínas.	A carência de vitamina E provoca alterações oculares, fraqueza muscular, lesões cutâneas e anemia. O excesso pode aumentar o risco de acidentes vasculares hemorrágicos.
K (K1 de origem vegetal, K2 de origem microbiana)	Fundamental para a produção de protrombina (substância envolvida no mecanismo de coagulação do sangue). Evita a calcificação das artérias, participa na mineralização dos ossos e regulação da divisão celular.	A sua carência resulta em coagulação deficiente e risco de hemorragia fortes em várias mucosas, desnutrição, má função do fígado e problemas intestinais.

Tabela 2.2 Principais fontes alimentares das vitaminas A, B, C, D, E e K (Paiva & Russell, 1999; INSA, 2007; Costa, 2008; Talvas *et al.*, 2010; Nimalaratne *et al.*, 2011).

Fontes Alimentares	
Vitamina A	Fígado e óleo de fígado de bacalhau, peixes gordurosos, gema de ovo e gordura láctea, brócolos, espinafres, vegetais e frutas amarelo-alaranjados como cenouras, abóboras, manga, alperces, maçã e mamão
Vitamina B	B1 – carne de porco magra, fígado, gema de ovo, amendoim, peixe, leguminosas, frutos do mar e cevada; B2 – leite de vaca e derivados, vísceras, carne magra e ovo; B3 – carne bovina magra, ave, peixe, leite de vaca, ovo, amendoim e castanhas; B5 – gema de ovo, rim, fígado, brócolos e carne magra; B6 – germe de trigo, carne de porco, fígado, cereais integrais, legumes e batatas; B8 – ovo, leite, nozes, cebola e cenouras; B9 – espinafres, espargos, brócolos, fígado e carne magra; B12 – carne vermelha, frutos do mar, leite, ovo, peixe, queijo e algas marinhas
Vitamina C	Frutas cítricas, kiwi, morango, frutos vermelhos (framboesas, mirtilos, amoras), melão, meloa, manga, papaia, couve-flor, brócolos, espinafres, ervilhas, pimentão e tomate
Vitamina D	Peixes gordos como o salmão, cavala ou sardinha, óleo de peixe (óleo de fígado de peixe), fígado dos mamíferos, gema do ovo, gordura do leite, cogumelos e alimentos suplementados como leite, margarina ou cereais
Vitamina E	Sementes e óleos vegetais (óleo de soja, óleo de semente de girassol, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão, óleo de milho), frutos secos (amêndoas, nozes, avelãs), margarina, azeite, amendoim, gordura do leite, gema do ovo, espinafres e brócolos
Vitamina K	Fígado, leite e laticínios, espinafres, espargos, brócolos, couve de bruxelas, ervilhas e óleo de soja

A manutenção de uma alimentação equilibrada e variada é suficiente para evitar carências vitamínicas, de toda a forma, existem situações que reduzem a quantidade das mesmas nos alimentos. O valor vitamínico dos alimentos é maioritariamente afetado pelo modo como estes são acondicionados e cozinhados. Algumas vitaminas não são alteradas pelo fator calor, como por exemplo a B2, a D e a E, no entanto, outras sofrem facilmente, permitindo-nos perceber o porquê do teor vitamínico de certos alimentos diminuir drasticamente, quando submetidos a tempos de cozedura prolongados. No caso específico das hidrossolúveis, quando sofrem cozedura, parte das vitaminas migram para a água e desta forma, se e só se houver o consumo dessa mesma água é que há a ingestão dessas vitaminas. Uma forma de contrariar este acontecimento é confeccionar os alimentos com casca, consumi-los crus, ou então realizar a sua preparação no momento exato da sua confeção, evitando desta forma, a oxidação por exposição ao ar e ao calor, preservando estas substâncias no alimento.

2.1.2 A descoberta das vitaminas

Em 1912, Kazamierz Funk, também conhecido como Casimir Funk, inventou o nome vitamina, baseada na palavra latina *vita* (vida), em virtude de ser considerada uma substância vital para o ser humano e no sufixo *-amina*, por possuir a característica química da amina (Berger, 2013).

"I must admit that when I chose the name "vitamine" I was well aware that these substances might later prove not all to be of an amine nature. However, it was necessary for me to use a name that would sound well and serve as a catch-word." Palavras de Casimir Funk segundo Combs (2008).

Embora atualmente existam várias vitaminas que não contêm o grupo amina (por exemplo, as lipossolúveis e o ácido ascórbico) este nome foi aceite em todo o mundo, especialmente nas ciências da nutrição e da alimentação, que desta forma se mantem até aos dias de hoje (Berger, 2013).

Apesar de somente no início do século XX ter sido isolado a primeira vitamina, o conhecimento da sua existência remonta há muitos séculos atrás. Em 300 a.C Hipócrates descreveu um tipo de cegueira que era revertida com a ingestão de fígado de animais, numa clara alusão à deficiência de vitamina A (Vieira, 2003). O significado de vitamina começou a ser aplicado no século XV, quando os cientistas constataram que, os nutrientes encontrados em vários alimentos podiam ser benéficos à saúde. Estes simulavam condições de deficiência de nutrientes usando animais e restringindo-os a um alimento específico e por um determinado período de tempo, de forma a descobrir o benefício que um alimento em particular poderia oferecer. Sob as condições determinadas, a saúde dos animais declinou, alguns ficaram doentes e outros, inclusive, faleceram. Como conclusão a esta investigação, os animais doentes alimentados com vários nutrientes, melhoraram o seu estado de saúde (Aditivos e Ingredientes, 2010).

Em 1911, Casimir Funk isolou um composto cristalino, do material extraído da casca do arroz, utilizado, nesse tempo, para curar a polineurite (doença de pombos), que conduziu ao nascimento do conceito de vitaminas, em 1912. Essa substância, que hoje em dia é denominada de vitamina B1, foi apenas a primeira de uma série de 13 compostos que se descobriu que os seres humanos não são capazes de as sintetizar, sendo indispensáveis na alimentação, de forma a garantir a realização de várias reações bioquímicas essenciais ao organismo (Vieira, 2003).

2.2 Os antioxidantes

A maior parte das reações que ocorrem na natureza são do tipo oxidação-redução, ou seja, uma parte oxida-se enquanto outra sofre um processo de redução. A oxidação dá-se em praticamente todo o tipo de moléculas, orgânicas ou inorgânicas e é extremamente importante nos sistemas vivos. No entanto, devido a estes processos oxidativos, o corpo humano produz naturalmente, radica livres durante o seu metabolismo, em particular na respiração celular e na síntese de moléculas mais complexas (Droge, 2002).

Segundo Olszewer, radical livre é qualquer espécie reativa com um ou mais eletrões desemparelhados na última camada eletrónica, o que o torna altamente instável e reativo. Essa instabilidade faz com que estes procurem estabilidade noutros elementos, como proteínas, lípidos, no ácido desoxirribonucleico (DNA) e no ácido ribonucleico (RNA) (Olszewer, 1995).

A partir da respiração celular, são formadas as espécies reativas de oxigénio (ROS) (Bianchi & Antunes, 1999) que estão envolvidas numa série de processos degenerativos devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres.

Na figura 2.1 está representado a formação de radicais livres a partir do oxigénio molecular. As principais espécies reativas de oxigénio são:

- Anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$);
- Oxigénio singleto (1O_2);
- Peróxido de hidrogénio (H_2O_2);
- Radical hidroxilo (OH^{\cdot});
- Radical peroxilo (ROO^{\cdot}).

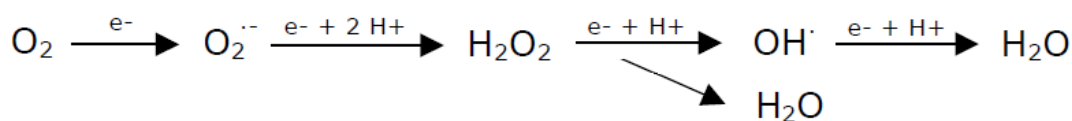


Figura 2.1 Formação de radicais livres a partir do oxigénio molecular.

As moléculas alvo das ROS, que estão relacionadas com o seu local de formação, podem tratar-se tanto de aminoácidos, lípidos, glícidos ou mesmo DNA, o que leva, inevitavelmente, ao envelhecimento celular (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997; Bianchi & Antunes, 1999; Almeida, 2013). As implicações do envelhecimento celular são vastas, desde o envelhecimento progressivo do ser humano, a diversas patologias como neurodegeneração, cancro, arteriosclerose, asma, artrites, inflamações, vulnerabilidade do sistema imune, entre outros (Halliwell *et al.*, 1992; Kalliora & Dedoussis, 2007).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos, que sustentam a vida, levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante para limitar os seus níveis intracelulares e impedir a indução de danos (Sies, 1993). Deste mecanismo, fazem parte substâncias capazes de inativar ou sequestrar as ROS devido à sua atividade antioxidante, aptas a atenuar o envelhecimento, representando desta forma, a defesa do organismo contra estas espécies (Halliwell, 2001; Eckert, 2006).

Uma ampla definição de antioxidante é: *“qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”* (Sies & Stahl, 1995; Bianchi & Antunes, 1999).

Desta forma, os antioxidantes são considerados os agentes responsáveis pela inibição, redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células e podem ainda estar associados à prevenção de várias doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e cancro (Kaliora & Dedoussis, 2007). Estes podem ser aplicados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina, sendo que frequentemente, alguns medicamentos podem aumentar a geração intracelular destes radicais (Doroshov, 1983; Halliwell *et al.*, 1995; Weijl *et al.*, 1997, Bianchi & Antunes, 1999).

O primeiro mecanismo de defesa do organismo é impedir a formação dos radicais livres e para tal, os antioxidantes terão de intercetar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os aminoácidos, a dupla ligação dos ácidos gordos polinsaturados e as bases do DNA, evitando, assim, a formação de lesões e perda da integridade celular. No entanto, este não é o único mecanismo de defesa, o outro está na base do reparo das lesões causadas. Este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Noutras situações, a resposta do organismo frente à geração de radicais livres, dá-se através do aumento da síntese de enzimas antioxidantes (Bianchi & Antunes, 1999).

A determinação do desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende de diversos fatores, tais como, os tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais, a análise e os métodos para a identificação dos danos provocados e as doses ideais na obtenção da proteção do organismo. Desta forma, é possível que um antioxidante atue como protetor de um determinado sistema e que falhe na proteção de outros sistemas ou tecidos (Halliwell *et al.*, 1995). A vitamina C, por exemplo, atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, no entanto, não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lípidos (Odin, 1997).

2.2.1 Oxidação de ácidos gordos insaturados

A oxidação lipídica, também designada de lipoperoxidação é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, sendo responsável pela formação de odores desagradáveis e pela rancificação dos alimentos, com a consequente diminuição da qualidade nutricional e da segurança, devido à formação de compostos secundários potencialmente tóxicos, que pode ser prevenida pela adição de antioxidantes (Burcham, 1998; Choe & Min, 2007; Pereira, 2010).

É um processo natural de deterioração oxidativa de lípidos polinsaturados, que devido às suas múltiplas ligações duplas são excelentes alvos para o ataque de radicais livres. Este processo está associado à reação do oxigénio molecular com os ácidos gordos insaturados, que consiste numa reação em cadeia compreendida em três passos fundamentais: iniciação, propagação e terminação (Figura 2.2) (Norberg & Arnér, 2001; Shahidi & Wanasundara, 2002).

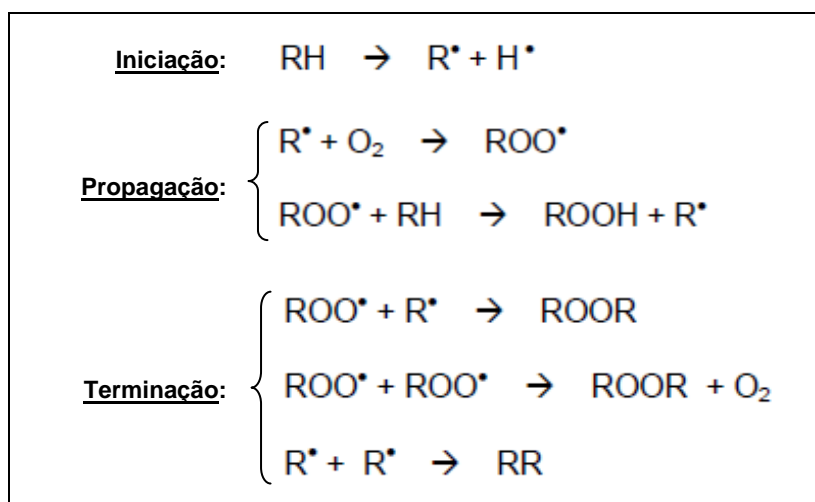


Figura 2.2 Mecanismo de autooxidação de ácidos gordos insaturados (Adaptado de: Shahidi & Wanasundara, 2002).

Na etapa de iniciação ocorre a remoção de um átomo de hidrogénio adjacente a uma ligação dupla do ácido gordo insaturado (RH), dando origem a um radical livre (R^{\bullet}) e a um átomo de hidrogénio, na presença de luz e calor. Na propagação, os radicais livres obtidos na etapa anterior (R^{\bullet}), por reação com o oxigénio, são convertidos em novos radicais livres instáveis (radical peroxilo ROO^{\bullet}). Estes irão reagir com o ácido gordo insaturado (RH), dando origem a novos radicais livres (R^{\bullet}). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, originando um processo autocatalítico. A etapa de terminação ocorre quando dois radicais livres (por exemplo, ROO^{\bullet} e R^{\bullet}), produzidos nas etapas anteriores, ligam-se para a formação de moléculas não radicalares estáveis (por exemplo, ROOR) (Jadhav *et al.*, 1996; Shahidi & Wanasundara, 2002; Andreo & Jorge, 2006; Ramalho & Jorge, 2006; Monteiro, 2007).

2.2.2 As classificações dos antioxidantes

As classificações para os agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres, são variadas. Segundo Reische, os antioxidantes podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, como antioxidantes primários e secundários, sendo que alguns que exibam mais do que um mecanismo de atividade são muitas vezes referidos como “antioxidantes multi-funções” (Reische *et al.*, 2002). No entanto, segundo Bailey, estes podem ser classificados em grupos mais específicos, tais como, antioxidantes primários, sinérgicos, que captam oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Ramalho & Jorge, 2006).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres, interrompendo a reação em cadeia da autoxidação dos lípidos, através da doação de átomos de hidrogênio (Ramalho & Jorge, 2006). O radical antioxidante, produzido pela doação do hidrogênio, é estabilizado pela deslocalização do eletrão desemparelhado em torno do anel benzênico, formando híbridos de ressonância estáveis. Assim, este como possui uma reatividade muito baixa com lípidos, reduz a taxa de propagação da reação de autoxidação (Reische *et al.*, 2002). Os principais antioxidantes primários são os tocoferóis (que pertencem ao grupo dos antioxidantes naturais) e os sintéticos, referidos posteriormente (Namiki, 1990). O mecanismo de ação dos antioxidantes primários foi apresentado por Frankel e encontra-se representado na figura 2.3 (Frankel, 1980).

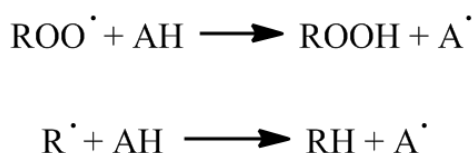


Figura 2.3 Mecanismo de ação de antioxidantes primários. Onde: ROO[•] e R[•] - radicais livres; AH - antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo; A[•] - radical inerte (Frankel, 1980; Reische *et al.*, 2002; Ramalho & Jorge, 2006)

Os antioxidantes secundários agem através de vários mecanismos, podendo diminuir a taxa de oxidação através de variadas ações, no entanto, são incapazes de converter radicais livres em produtos mais estáveis. Estes podem quelar metais desativando-os, podem decompor hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou mesmo atuar como capturadores de oxigênio. São também muitas vezes referidos como sinérgicos, pois promovem a atividade antioxidante de outros (Reische *et al.*, 2002).

Os antioxidantes sinérgicos são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, no entanto podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando

usados numa combinação adequada (Ramalho & Jorge, 2006), tal como, o efeito cooperativo entre as vitaminas C e E. Estudos demonstraram que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lípidos da membrana e na proteção do DNA (Bianchi & Antunes, 1999).

Os antioxidantes que capturam o oxigénio presente no meio, fazem-no através de reações químicas estáveis, tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. O ácido ascórbico e seus derivados são os melhores exemplos deste grupo (Ramalho & Jorge, 2006).

Os antioxidantes biológicos são compostos que podem remover o oxigénio ou os compostos altamente reativos presentes num género alimentício. Neste grupo estão incluídas várias enzimas, como a glucose oxidase, a superóxido dismutase e a catalase. Os agentes quelantes, tais como, o ácido cítrico e os seus sais, fosfatos e sais de ácido etilenodiamino tetra-acético, complexam iões metálicos, principalmente o cobre e o ferro, que catalisam a oxidação lipídica (Ramalho & Jorge, 2006).

Nos antioxidantes mistos estão incluídos compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre estes encontram-se várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (Ramalho & Jorge, 2006; Food Ingredients Brasil, 2009).

Tal como acima referido, as classificações atribuídas aos antioxidantes são diversas, de tal forma, que uma outra classificação também costuma ser recorrente. Os antioxidantes podem ser divididos em três grupos, os naturais, enzimáticos e os sintéticos. Na tabela 2.3 são demonstrados alguns exemplos.

Tabela 2.3 Alguns constituintes dos grupos de antioxidantes naturais, enzimáticos e sintéticos (Sies, 1993; Bianchi & Antunes, 1999; Reische *et al.*, 2002; Food Ingredients Brasil, 2009).

Antioxidantes naturais	Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes sintéticos
Ácido ascórbico	Superóxido dismutase (SOD)	Butil-hidroxi-anisol (BHA)
Tocoferóis	Catalase (CAT)	Butil-hidroxi-tolueno (BHT)
Carotenóides	Glutathione peroxidase (GPx)	Propil galato (PG)
Flavonóides	Glucose oxidase	Terc-butil-hidroquinona (TBHQ)

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos em pequenas quantidades, que possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres. Os

principais antioxidantes obtidos através da dieta, são as vitaminas C e E, os flavonóides e os carotenóides (Bianchi & Antunes, 1999). O ácido ascórbico é correntemente utilizado como agente sinérgico para doar hidrogénios aos antioxidantes primários, tais como o tocoferol. Os radicais formados pela oxidação dos tocoferóis, são reduzidos pelo ácido ascórbico à sua forma inicial (Madhavi *et al.*, 1996; Reische *et al.*, 2002). A atividade antioxidante dos tocoferóis deve-se principalmente à sua capacidade de interromper a propagação da autooxidação dos lípidos e por esse motivo é amplamente utilizada na prevenção da oxidação dos ácidos gordos insaturados. É considerado um dos melhores antioxidantes naturais, que tem como objetivo inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis (Ramalho & Jorge, 2006). Os carotenóides podem atuar como antioxidantes primários, captando os radicais livres, ou como secundários, sendo capazes de capturar o oxigénio singleto. O oxigénio singleto é instável e pode reagir com lípidos para produzir radicais livres, no entanto, na presença de β -caroteno, este vai preferencialmente reagir com o antioxidante (Pallett & Young, 1993). Os flavonóides podem atuar como antioxidantes primário e captadores do anião superóxido. Estes são responsáveis pela atividade antioxidante, relatada em muitos extratos de plantas e especiarias (Reische *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos e alguns dos seus derivados são eficazes na prevenção da oxidação lipídica, no entanto, poucos são permitidos em alimentos, devido principalmente à sua toxicidade (Shahidi *et al.*, 1992).

Dos antioxidantes enzimáticos fazem parte a glucose oxidase, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Estas são enzimas antioxidantes, presentes nos tecidos musculares, que removem do ambiente lipídico o oxigénio e as espécies altamente oxidativas (Erickson, 2002). Juntas constituem a primeira linha de defesa do organismo na destruição dos radicais livres. A glucose oxidase é uma enzima que remove o oxigénio, de forma a produzir, entre outros, o peróxido de hidrogénio. A enzima SOD reduz o radical superóxido a um estado tripleto e forma o peróxido de hidrogénio. A CAT e a GPx trabalham simultaneamente com a proteína glutathione para converter o peróxido de hidrogénio em água. A glutathione, agora oxidada, é reduzida por outra enzima oxidante, a glutathione reductase. Estas enzimas antioxidantes são capazes de consertar o DNA oxidado e reduzir a proteína oxidada (Erickson, 2002; Food Ingredients Brasil, 2009).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propil galato) e o TBHQ (terc-butil-hidroquinona). A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um protão a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação destes. Os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres, no entanto, podem estabilizar-se sem promover ou propagar reações de oxidação (Buck, 1981). O BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. O BHT tem propriedades semelhantes ao BHA e age como sinergista para com este, funcionando como regenerador dos

seus radicais. O BHA é um sinergista para o PG e atua como capturador de radicais peróxidos. O BHA e o BHT podem conferir odor em *alimentos* quando submetidos a altas temperaturas em condições de fritura. O PG tem uma concentração ótima de atividade como antioxidante e quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante. O TBHQ é considerado o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados (Shahidi & Zhong, 2005; Ramalho & Jorge, 2006).

2.2.3 Os antioxidantes nos alimentos

Os antioxidantes são substâncias que protegem os géneros alimentícios da deterioração por processos de oxidação, aumentando assim a sua durabilidade (Lidon & Silvestre, 2010). Estes estão presentes de forma natural ou intencional nos alimentos para retardar o aparecimento dos fenómenos de oxidação, no sentido de manter intactas as suas características. Desta forma, os antioxidantes que se adicionam aos alimentos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, nem produzir cores, odores e sabores anómalos. Devem ser lipossolúveis, resistentes aos tratamentos a que se sejam submetidos os alimentos e capazes de permanecer ativos em baixas temperaturas (Ordóñez, 2005).

No entanto, tem sido estudada a possibilidade de antioxidantes sintéticos apresentarem efeitos tóxicos ao organismo. Como resultado de diversas investigações científicas, determinadas organizações, tais como, *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) da *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) têm alterado a ingestão diária aceitável destas substâncias (Würtzen, 1990; Soares, 2002). Estudos toxicológicos realizados em animais têm demonstrado a possibilidade de antioxidantes sintéticos apresentarem efeitos carcinogénicos. Desta forma é apresentado mais um motivo para que o seu uso em alimentos seja limitado (Botterweck *et al.*, 2000).

Segundo o *Codex Alimentarius*, a concentração máxima permitida para o BHT é de 200 mg/kg na maior parte dos géneros alimentícios, salvo exceções de carne processada, caldos, molhos e sopas, gelados (100 mg/kg), óleo de manteiga (75 mg/kg) e de pastilha elástica e suplementos alimentares (400 mg/kg) (Codex Alimentarius Commission, 2014a). A concentração máxima permitida para o TBHQ é de 200 mg/kg na maior parte dos géneros alimentícios, salvo em carnes processadas e bebidas brancas (100 mg/kg) e pastilhas elásticas (400 mg/kg) (Codex Alimentarius Commission, 2014b). Para o BHA, os limites são também de 200 mg/kg na maior parte dos géneros alimentícios, com as exceções de bebidas brancas e leite em pó (100 mg/kg), óleos de manteiga (175 mg/kg) e pastilha elástica e suplementos alimentares (400 mg/kg) (Codex Alimentarius Commission, 2014c).

Tendo em conta os problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, diversos estudos têm sido dirigidos no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que permitirão substituir os sintéticos (largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por aumentarem a vida útil), ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir a sua quantidade nos alimentos e consequentemente, reduzir os problemas que poderão provir da sua ingestão (Soares, 2002).

2.2.4 O envelhecimento celular

O número de radicais livres existentes no nosso organismo aumenta em consequência do ambiente em que vivemos e do estilo de vida que temos (Bianchi & Antunes, 1999). O envelhecimento celular é algo que ocorre, inevitavelmente, com o passar do tempo e deve-se a fatores internos (stress oxidativo, dano mitocondrial, dano e reparo do DNA, *protein turnover*), fatores externos (poluição ambiental, radiações ionizantes) e estilo de vida (dieta, consumo de álcool e tabaco). O organismo responde ativamente aos estímulos do meio e adapta-se constantemente a novas circunstâncias, obrigando a que o DNA, proteínas e lípidos sejam protegidos, de forma a que o funcionamento do organismo seja garantido. No entanto, quando o sistema que mantém a homeostase celular entra em declínio, inicia-se o processo de envelhecimento, ocorrendo deterioração progressiva das estruturas biológicas e envelhecimento da codificação do DNA (Gava & Zanoni, 2005).

Nenhum dos fatores, acima mencionados, é considerado, individualmente, o responsável pelo envelhecimento, sendo que o mecanismo base deste processo está no desequilíbrio entre o dano e a reparação a longo prazo, resultando num favorecimento dos danos (Gava & Zanoni, 2005; Eckert, 2006).

O stress oxidativo é resultante da formação e ação das espécies reativas de oxigénio que estão envolvidas no processo de envelhecimento celular e nos danos oxidativos induzidos nas células e tecidos. Estes têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças neuronais (*Alzheimer* e *Parkinson*), doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose, artrite, problemas pulmonares, doenças cardiovasculares, cataratas e diabetes. Os danos causados pelos radicais livres no DNA, desempenham um papel relevante nos processos de mutagénese e carcinogénese (Bianchi & Antunes, 1999; Manton *et al.*, 2004; Kaliora & Dedoussis, 2007).

2.3 Os tocoferóis

Herbert McLean Evans e Katharine J. Scott Bishop, em 1922, observaram que a ausência de um componente alimentício lipossolúvel na dieta de ratos fêmeas grávidas, resultava na reabsorção ou morte fetal (Evans & Bishop, 1922; Batista *et al.*, 2007). Por sua vez, quando o germe de trigo era incluído na dieta, a síndrome de reabsorção fetal não era observada. Desta forma, esta síndrome foi atribuída à deficiência de um componente ativo, o qual foi denominado de vitamina E (Batista *et al.*, 2007).

Essa substância recebe o nome de tocoferol, que deriva das palavras gregas *tocos*, que significa nascimento, e *pherein*, que significa transportar (Azzi & Stocker, 2000).

O nome foi dado para realçar o seu papel, essencial, na reprodução das várias espécies animais, uma vez que a vitamina E tem sido descrita em vários estudos científicos como a vitamina da fertilidade (Aditivos e Ingredientes, 2010).

A natureza múltipla da vitamina E foi descoberta por Evans e colaboradores em 1936, quando dois compostos, com uma atividade específica, foram isolados e caracterizados a partir de óleo de gérmen de trigo, que foram designados por α -tocopherol e β -tocopherol (Evans *et al.*, 1936). Nos anos que se seguiram, dois tocoferóis adicionais o γ -tocopherol e o δ -tocopherol, bem como os tocotrienóis, foram isolados a partir de óleos vegetais comestíveis (Azzi & Stocker, 2000).

O químico suíço, Paul Karrer realizou a síntese desta vitamina em 1938 e posteriormente os efeitos do complexo da vitamina E foram destacados, primeiro em animais e posteriormente em seres humanos (Aditivos e Ingredientes, 2010).

No ano de 1968 a *American Food and Nutrition Board* reconheceu oficialmente a vitamina E como um nutriente essencial para os seres humanos. Os investigadores confirmaram, desde então, a importância da mesma como um antioxidante que pode proteger a integridade dos tecidos e desempenhar um papel fulcral nos processos essenciais à vida (Azzi & Stocker, 2000).

2.3.1 Química do tocoferol e do tocotrienol

A vitamina E é um termo geral usado para designar oito compostos lipossolúveis, que se dividem em dois grupos. Os compostos de ambos os grupos são todos os derivados de 6-cromanol. O primeiro grupo é derivado do tocol e apresenta uma cadeia lateral saturada, contendo 16 átomos de carbono e três centros quirais nas posições 2, 4' e 8' e inclui quatro dos oito compostos, sendo eles o α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e o δ -tocoferol. O β -tocoferol e γ -tocoferol são isômeros de posição e a única diferença entre estes, consiste nas substituições dos grupos –metil serem feitas em locais diferentes do anel aromático. No segundo grupo de substâncias, com atividade biológica da vitamina E, derivado do tocotrienol, estão incluídas quatro moléculas, sendo estas o α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol e o δ -tocotrienol. A diferença destas para as suas homólogas anteriores reside no facto da cadeia lateral de 16 átomos de carbono ser insaturada e não saturada como nos tocoferóis (Figura 2.4) (Azzi & Stocker, 2000; Batista *et al.*, 2007).

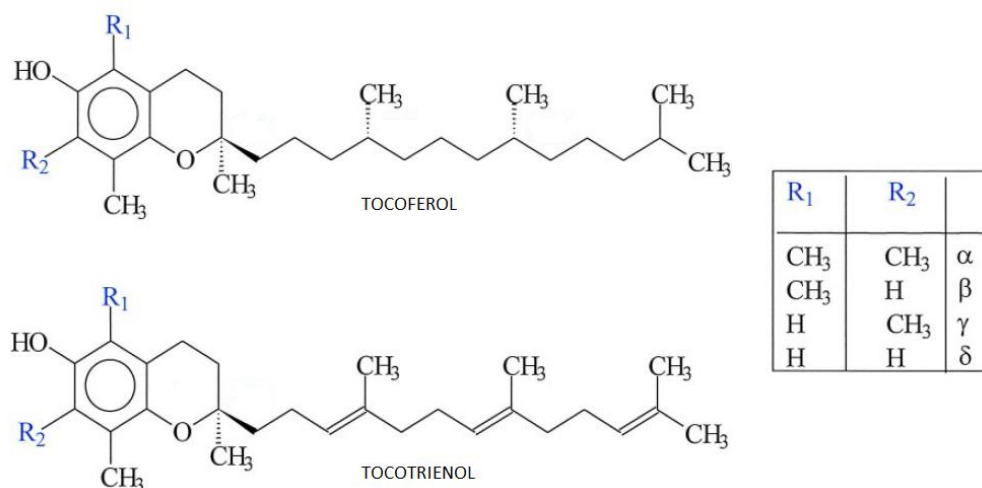


Figura 2.4 Estrutura química geral dos dois grupos de compostos da vitamina E (Adaptado de: Azzi & Stocker, 2000).

Os tocoferóis são naturais de benzopiranos fenólicos que exibem atividades antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Desde a sua descoberta, têm sido fonte de estudo na tentativa de compreender o seu mecanismo de ação e identificar os potenciais metabolitos. Burton e colaboradores estudaram os efeitos da estrutura química dos compostos fenólicos sobre a reatividade para os radicais peróxido. Ao medir a constante de velocidade de transferência do hidrogénio para o radical peróxido, a partir dos tocoferóis e relacionados fenóis, descobriram que o composto α -tocoferol obteve a constante mais elevada, de todos os oito compostos analisados. Esta constante é principalmente determinada pela energia de dissociação da

ligação O-H fenólica, a qual é influenciada pelos efeitos estéreo-eletrônicos e pelos efeitos dos constituintes. Estes investigadores demonstraram ainda que o anel cromanol apresenta uma estrutura otimizada para a estabilização da ressonância, causada pelo eletrão não emparelhado do radical α -tocoferoxil e que os substituintes (por exemplo, grupos metilo) aumentam este efeito (Burton *et al.*, 1983).

A forma natural de vitamina E não é idêntica à sua forma sintética. Ao contrário da forma natural do α -tocoferol, a sua forma sintética, designada *de all-rac- α -tocoferol*, contém oito estereoisómeros, resultantes dos três estereocentros da molécula (Azzi & Stocker, 2000), que são o RRR- α -tocoferol, RRS- α -tocoferol, RSR- α -tocoferol, RSS- α -tocoferol, SSS- α -tocoferol, SSR- α -tocoferol, SRS- α -tocoferol e o SRR- α -tocoferol. A forma sintética da vitamina E contém cerca de 12,5% de cada estereoisómero (Weiser *et al.*, 1996). A atividade biológica, bem como a biodisponibilidade e a biodiscriminação dos derivados de tocoferol e dos seus estereoisómeros têm sido estudadas por diversos autores (Weiser & Vecchi, 1982; Weimann & Weiser, 1991; Weiser *et al.*, 1996; Azzi & Stocker, 2000; Dersjant *et al.*, 2009).

Vários estudos são baseados na gestação/reabsorção fetal em ratos e são diversos os que avaliam as atividades biológicas dos tocoferóis. Weimann e Weiser realizaram um estudo sobre a atividade biológica dos RRR- α -, β -, γ - e δ -tocoferol e também do R- α -tocotrienol, na gestação/reabsorção fetal em ratos. Neste, foi então demonstrada a preferência para o derivado natural mais abundante de vitamina E, o RRR- α -tocoferol, seguido do RRR- β -tocoferol, RRR- γ -tocoferol, R- α -tocotrienol e por último o RRR- δ -tocoferol, como pode ser visualizado na tabela 2.4 (Weimann & Weiser, 1991). Apesar do facto de que os estereoisómeros sintéticos do α -tocoferol devem possuir propriedades antioxidantes iguais, estes têm atividades biológicas diferentes. Isso indica que as características estruturais do α -tocoferol são muito importantes, consequentemente, as alterações na atividade biológica dos tocoferóis dependem da sua estrutura específica. Nestas estão incluídas a cadeia lateral ramificada, a presença ou ausência de grupos metilo no anel aromático e a estereoquímica dos carbonos quirais (Azzi & Stocker, 2000).

De modo a avaliar e a compreender a biodisponibilidade relativa do RRR- α -tocoferol em comparação com os seus estereoisómeros, no plasma e nos tecidos, têm sido conduzidos vários estudos em animais. Nestes foi estabelecido um *ratio* de 1,36 para o natural RRR- α -tocoferol em relação ao *all-rac- α -tocoferol* (Azzi & Stocker, 2000).

Noutra investigação, a biodiscriminação dos oito estereoisómeros do α -tocoferol foi acompanhada por um período de 90 dias, ao administrar a ratos fêmeas alimentadas com uma dieta deficiente em vitamina E, 0,82 mg de *all-rac- α -tocoferil acetato*. Nos tecidos e no plasma, foi visível a acumulação, preferencial, dos quatro estereoisómeros 2R (15-22% cada), estando a soma de todas as suas formas compreendidas entre 70 a 86%. Compreendidos nos 14 a 30% restantes, encontram-se os estereoisómeros 2S com predominância da forma SRS. A

administração de *all-rac*- α -tocoferol levou à presença de todos os oito estereoisômeros no fígado, cérebro, tecido adiposo e plasma. No entanto, os quatro estereoisômeros 2R, incluindo o RRR- α -tocoferol, estavam igualmente e significativamente presentes em maiores quantidades (Weiser *et al.*, 1996).

Dersjant e colaboradores também avaliaram a biodiscriminação biológica dos estereoisômeros do α -tocoferol. Neste estudo, os animais de criação foram alimentados com substitutos do leite suplementados com 80 mg/kg de *all-rac*- α -tocoferil acetato. Foram coletadas amostras de sangue, fígado, tecido adiposo, músculo e cérebro no momento do abate e a distribuição dos diferentes estereoisômeros do α -tocoferol foi analisada. Verificou-se então que RRR- α -tocoferol é o estereoisômero dominante no plasma e tecidos e que os estereoisômeros 2R- α -tocoferol apresentam menor eficiência de utilização que o estereoisômero RRR- α -tocoferol, porém maior que os 2S- α -tocoferol que, basicamente, não foram utilizados (Dersjant *et al.*, 2009).

Tabela 2.4 Atividade biológica dos tocoferóis naturais, tocotrienóis e estereoisômeros sintéticos do α -tocoferil acetato (Weiser & Vecchi, 1982; Weimann & Weiser, 1991; Weiser *et al.*, 1996; Azzi & Stocker, 2000)

		Atividade %
<u>Derivados naturais:</u>	RRR- α -tocoferol	100
	RRR- β -tocoferol	57
	RRR- γ -tocoferol	37
	RRR- δ -tocoferol	1.4
	R- α -tocotrienol	30
	R- β -tocotrienol	5
<u>Derivados sintéticos:</u>	RRR- α -tocoferil acetato	100
	RRS- α -tocoferil acetato	90
	RSS- α -tocoferil acetato	73
	SSS- α -tocoferil acetato	60
	RSR- α -tocoferil acetato	57
	SRS- α -tocoferil acetato	37
	SRR- α -tocoferil acetato	31
	SSR- α -tocoferil acetato	21

Os cientistas Weiser e Vecchi determinaram, em 1982, a atividade biológica dos estereoisômeros individuais de α -tocoferol e no geral, os 2R, revelaram serem mais ativos do que as formas 2S. As atividades biológicas dos estereoisômeros do composto α -tocoferil acetato também foram determinadas e estão indicadas na tabela 2.4 (Weiser & Vecchi, 1982; Weiser *et al.*, 1996).

Os autores de estudos em humanos concluem, consistentemente, que a biodisponibilidade de RRR- α -tocoferol é até três vezes mais elevada que a do *all-rac*- α -tocoferol. Nestes, foi também claramente demonstrado que todos os epímeros 2R, em comparação com os epímeros 2S, são preferencialmente retidos no homem, o que implica a existência de fatores de ligação de tocoferol com estereoespecificidade para com o estereoisômero natural RRR- α -tocoferol. De facto, a configuração em C-2 da molécula α -tocoferol, possui um grande impacto sobre a estrutura tridimensional da molécula e a alteração da configuração de R para S nesse carbono, leva à inversão do ângulo entre a cauda fitol e o anel cromanol, o que afeta, em grande parte, a biodiscriminação dos estereoisômeros desta estrutura. Ainda ficou demonstrado que a influência das mudanças estruturais dos carbonos quirais C-4 e C-8 é menos pronunciada (Weiser *et al.*, 1996; Kiyose *et al.*, 1997; Azzi & Stocker, 2000; Dersjant *et al.*, 2009).

2.3.2 Absorção, transporte e excreção

A vitamina E requer, devido à sua hidrofobicidade, mecanismos de transporte especiais no ambiente aquoso do plasma, dos fluidos corporais e das células (Azzi & Stocker, 2000). A absorção desta vitamina segue o processo do metabolismo lipídico, estando dependente da ação de sais biliares, formação de micelas e incorporação em quilomicras nos enterócitos, para posterior transporte no sangue (Figura 2.5) (Mourão *et al.*, 2005). Assim, esta substância é recolhida na parte proximal do intestino delgado e emulsificada juntamente com outros componentes solúveis em gordura. A ação da lipase pancreática e a emulsificação das gotículas lipídicas formadas, leva à formação espontânea de micelas mistas. Por difusão passiva, estas são absorvidas na membrana da borda da escova da mucosa intestinal (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). A eficiência de absorção da vitamina E parece ser maior quando solubilizada em micelas contendo triglicéridos com ácidos gordos de cadeia média, quando comparada aos de cadeia longa (Mourão *et al.*, 2005).

Os tocoferóis juntamente com triglicéridos, fosfolípidos, colesterol e apolipoproteínas formam os quilomicras (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). Parece não haver discriminação entre as diferentes formas de vitamina E, a nível intestinal (Polidori, 2007), pelo que todas são

absorvidas pelas células intestinais e libertadas na circulação sob a forma de quilomicras (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). Através da ação da lipoproteína lipase (LPL) parte dos tocoferóis são captados pelos tecidos extra-hepáticos e os restantes são transportados pelos quilomicras residuais e encaminhados para o fígado (Boni *et al.*, 2010).

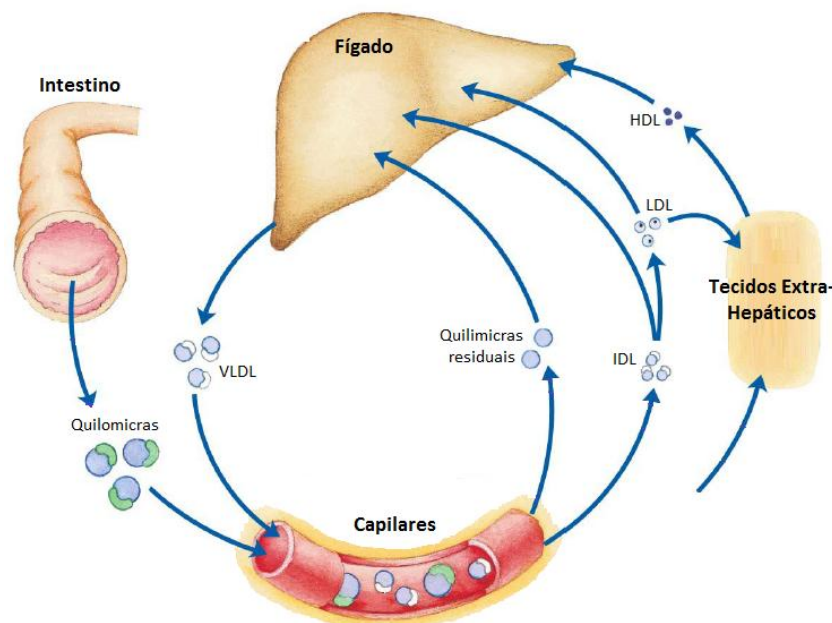


Figura 2.5 Lipoproteínas e transporte de lipídios (Adaptado de: Nelson & Cox, 2005)

Em contraste com a não especificidade da absorção da vitamina E pelas células hepáticas, no fígado, a proteína específica α -tocoferol transferase (α -TTP), medeia a transferência do α -tocoferol das células hepáticas para as lipoproteínas (Azzi & Stocker, 2000). As formas de α -tocoferol (RRR- α -tocoferol e 2R-estereoisómeros), são diferenciadas das restantes formas da vitamina E, β -, γ - e δ - tocoferóis, α -, β -, γ - e δ - tocotrienóis e são incorporadas em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Polidori *et al.*, 2007).

Um estudo sobre a especificidade da α -TTP demonstrou a alta preferência desta proteína para a forma α -tocoferol. A partir de análogos da vitamina E, as características estruturais necessárias para o reconhecimento da α -TTP foram avaliadas e as afinidades relativas foram calculadas, sendo RRR- α -tocoferol 100%; β -tocoferol 38%; α -tocotrienol 12%; SRR- α -tocoferol 11%; γ -tocoferol 9%; δ -tocoferol 2% e α -tocoferil acetato 2%. Com este estudo concluiu-se que todos os três grupos metilo no anel cromanol são importantes para o reconhecimento da α -TTP, sendo o grupo metilo na posição 5 especialmente crítico, dado a diferença na afinidade entre β - e γ -tocoferóis e que o grupo hidroxilo no anel cromanol também é essencial para o reconhecimento desta proteína específica (Hosomi *et al.*, 1997; Traber & Arai, 1999).

A α -TTP possui, desta forma, tanto estereoespecificidade como regioespecificidade, para com o isómero mais abundante da vitamina E, o RRR- α -tocoferol (Azzi & Stocker, 2000). Estudos utilizando isómeros deuterados de RRR- α -tocoferol e SRR- α -tocoferol têm demonstrado que este processo de seleção é altamente discriminatório. Após a administração de quantidades iguais dos dois isómeros em indivíduos saudáveis e no decorrer das 24 horas, os quilomicras continham aproximadamente a mesma quantidade de cada um dos isómeros. No entanto, após as 24 horas, a concentração do isómero RRR começou a dominar na concentração plasmática, pois foi secretado preferencialmente na fração de lipoproteínas produzidas no fígado (Wang & Quinn, 1999).

A vitamina E é então, transportada no organismo como componente de lipoproteínas plasmáticas, uma vez que as VLDL, contendo tocoferóis, são segregadas do fígado para a corrente sanguínea (Wang & Quinn, 1999; Berg *et al.*, 2008). As lipoproteínas de muito baixa densidade são hidrolisadas por lipases nas paredes dos capilares. Os remanescentes, também designados de IDL (lipoproteína de densidade intermédia), têm dois destinos, metade são captados pelo fígado e metade são transformados em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Berg *et al.*, 2008). Devido à sua hidrofobicidade, α -tocoferol é transportado em associação com as lipoproteínas no compartimento plasmático (Azzi & Stocker, 2000), sendo a LDL o principal transportador de α -tocoferol no sangue (Polidori *et al.*, 2007). A LDL contém entre 6 e 12 moléculas de α -tocoferol e menores quantidades de γ -tocoferol (0,5 mol/LDL).

A estrutura da LDL consiste num cerne de cerca de 1500 moléculas de colesterol esterificado e numa capa de fosfolípidos e de colesterol não esterificado, que envolve este cerne altamente hidrofóbico (Figura 2.6). A capa contém a apolipoproteína B-100, que é reconhecida pelas células alvo. Acredita-se que o tocoferol está localizado no interior da monocamada fosfolipídica (Wang & Quinn, 1999).

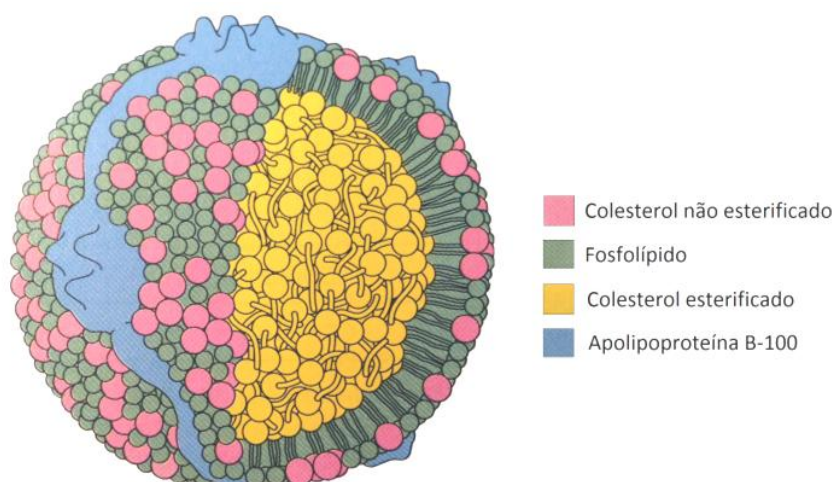


Figura 2.6 Modelo esquemático da lipoproteína de baixa densidade (Adaptado de: Berg *et al.*, 2008).

A vitamina E é extensivamente degradada antes da excreção (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Polidori *et al.*, 2007). O primeiro metabolito observado, α -tocoferil quinona, foi descrito como o principal produto da oxidação hepática, sendo o resultado da reação entre o radical tocoferoxil e o radical peroxilo. O α -tocoferil quinona pode ser reduzido a α -tocoferil hidroquinona pela ação de enzimas dependentes de NAD(P)H (Figura 2.7) (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). Posteriormente foram descobertos dois grandes metabolitos urinários, o ácido tocoferônico e a tocoferonolactona, derivados do α -tocoferil quinona, também designados de metabolitos de Simon (Figura 2.8). Estes têm uma cadeia lateral encurtada e o anel cromanol aberto, o que indica que foram formados a partir do α -tocoferol que reagiu como antioxidante. Ambos os metabolitos são excretados na urina sob a forma de glicoronídeos ou sulfatos. (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Polidori *et al.*, 2007). Estes metabolitos são frequentemente citados como prova da função antioxidante do α -tocoferol *in vivo* e estudos realizados em voluntários saudáveis demonstraram que, após a dose diária de 2-3 g de all-rac- α -tocoferol, a concentração destes metabolitos aumentou na urina.

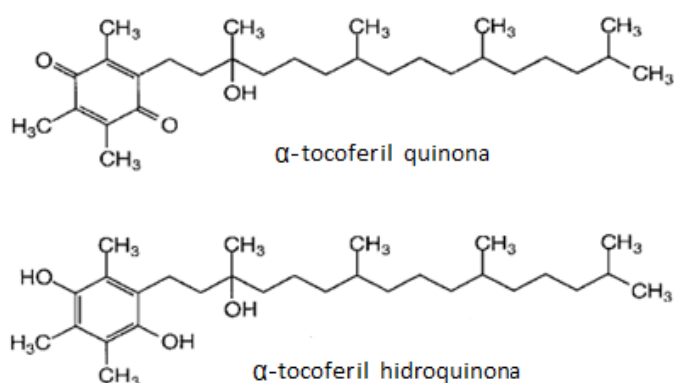


Figura 2.7 Estrutura química dos metabolitos: α -tocoferil quinona e α -tocoferil hidroquinona (Adaptado de: Brigelius-Flohé & Traber, 1999).

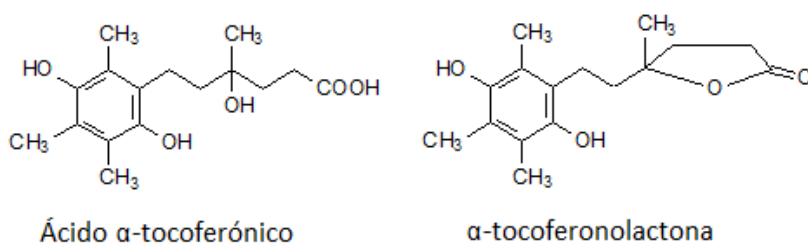


Figura 2.8 Estrutura química dos metabolitos: ácido α -tocoferônico e α -tocoferonolactona (Adaptado de: Christie, 2014).

Mais de 40 anos depois, o metabolismo da vitamina E, em humanos, foi novamente analisado e em vez dos metabolitos de Simon, um novo composto foi identificado após a suplementação com α -tocoferol (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002). O principal metabolito urinário 2,5,7,8-tetrametil-2-(2'-carboxiethyl)-6-hidroxicromano, ou simplesmente α -CEHC, foi então descoberto. Este consiste numa estrutura com a cadeia lateral reduzida e com o anel cromanol intacto, sugerindo que é formado diretamente do α -tocoferol, sem formação de α -tocoferil quinona, ou seja, a partir do tocoferol que não reagiu como antioxidante (Figura 2.9) (Polidori *et al.*, 2007). A correlação entre a ingestão de α -tocoferol e a excreção urinária de α -CEHC foi examinada em voluntários humanos suplementados com RRR- α -tocoferol na gama de 0-800 mg/dia. A análise revelou que o metabolito α -CEHC foi apenas excretado sobre uma ingestão diária de 150 mg de α -tocoferol. Esta quantidade foi interpretada como um indicador da saturação de plasma pela vitamina E, podendo ser considerada como marcador do consumo máximo de vitamina E (Azzi & Stocker, 2000).

A degradação começa com uma ω -hidroxilação inicial, catalisada pelo citocromo P450, resultando nas respetivas formas hidroxi-tocoferóis e -tocotrienóis. Estes são posteriormente oxidados a ácidos carboxílicos e encurtados por β -oxidações em cinco passos, dando origem ao metabolito final CEHC. Tendo os tocoferóis como exemplo, os metabolitos resultantes das cinco β -oxidações são os CDMDHC (carboxidimetildecilhidroxicromano), CDMOHC (carboxidimetiloctilhidroxicromano), CMHHC (carboximetilhexilhidroxicromano), CMBHC (carboximetilbutilhidroxicromano) e por fim, o metabolito CEHC (Polidori, 2007). O caminho proposto para a degradação da cadeia lateral via ω -hidroxilação inicial e β -oxidação, foi confirmado pela identificação de todos os possíveis intermediários formados a partir de tocoferóis e tocotrienóis (Brigelius-Flohé *et al.*, 2002; Polidori *et al.*, 2007). Assim, as estruturas de CEHC são produtos finais do tocoferol e do tocotrienol. Estes metabolitos são conjugados com ácido glucorónico ou sulfatos e são excretados na urina (Polidori *et al.*, 2007).

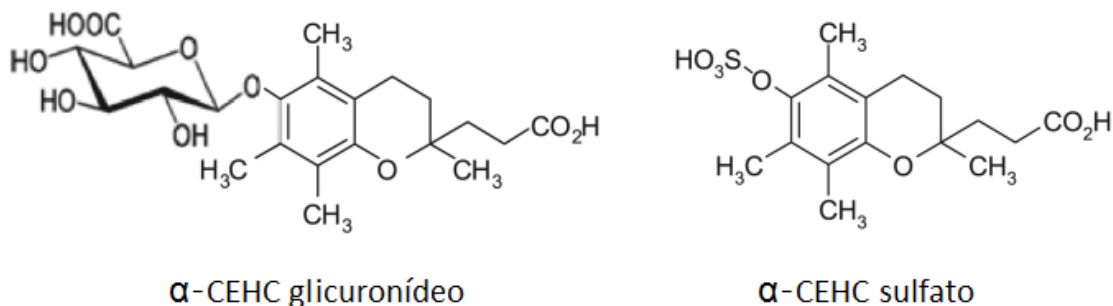


Figura 2.9 Estrutura química do metabolito urinário α -CEHC conjugado com ácido glucorónico e conjugado com sulfato (Adaptado de: Sharma *et al.*, 2013).

2.3.3 Mecanismos de ação

Para proteger as células dos processos de oxidação causados pelos radicais livres, as próprias possuem um sistema de defesa que atua em duas linhas. A primeira linha atua como desintoxicante, destinado a remover os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, evitando a formação de lesões. Esta primeira linha é constituída pelos antioxidantes glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reduzida, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e vitamina E. A segunda linha de defesa da célula tem como função reparar a lesão ocorrida, sendo constituída por ácido ascórbico, glutathione peroxidase e glutathione-redutase (Batista *et al.*, 2007).

Dado a sua natureza lipossolúvel, a vitamina E apresenta-se como componente estrutural das membranas celulares, enquanto que, a maior parte dos demais agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Batista *et al.*, 2007), como é o caso da vitamina C que atua na fase aquosa como um excelente antioxidante, mas não tem a capacidade de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a lipoperoxidação (Odin, 1997).

A vitamina E é considerada um poderoso antioxidante, capaz de reagir 200 vezes mais rápido contra os radicais peróxido (ROO^\bullet), que os antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ (Batista *et al.*, 2007). Além disso, esta atua sinergicamente com outros sistemas antioxidantes, especificamente com a glutathione peroxidase e com a vitamina C. Estes ao reduzirem a forma oxidada da vitamina E, regeneram a sua poderosa ação antioxidante (Figura 2.10) (Scotti *et al.*, 2007).

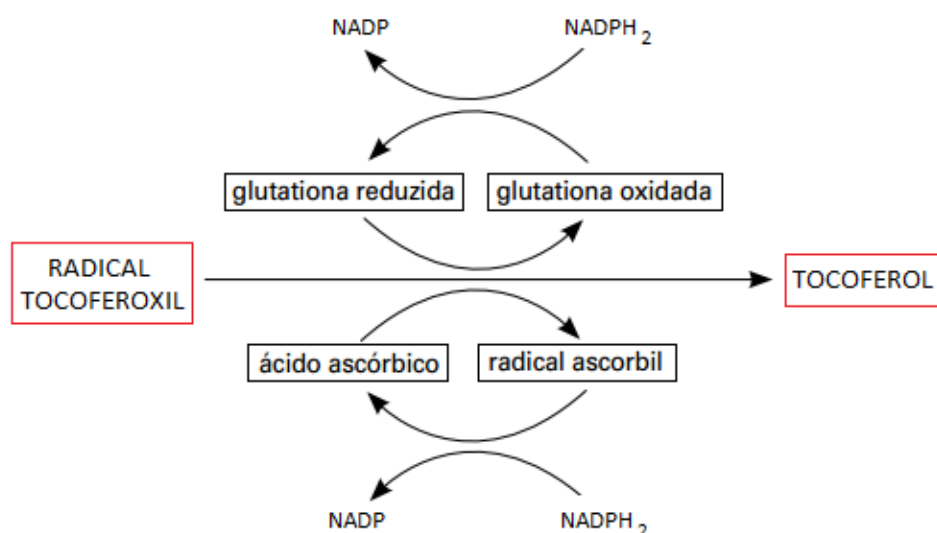


Figura 2.10 Esquemática da regeneração do tocoferol (Adaptado de: Aditivos e Ingredientes, 2010).

A ubiquinona tem a importante função de regenerar o tocoferol na membrana mitocondrial, onde exerce a mesma função regenerativa que o ácido ascórbico na membrana celular (Barreiros *et al.*, 2006). O radical tocoferoxil formado após neutralização dos radicais livres pode, na presença de ubiquinol, ser regenerado a tocoferol (Barreiros *et al.*, 2006; Scotti *et al.*, 2007).

Assim, ao mesmo tempo que o tocoferol protege a membrana celular é regenerado através de um mecanismo sinérgico, pelo ácido ascórbico nas membranas celulares e pela ubiquinona na membrana mitocondrial (Barreiros *et al.*, 2006). A presença de vitamina E nas membranas celulares é de extrema importância, pois exerce um efeito protetor contra a degradação lipídica e através destes mecanismos sinérgicos, os tocoferóis podem continuar a exercer a sua, tão necessária, ação antioxidante (Batista *et al.*, 2007).

Devido às potentes propriedades antioxidantes dos tocoferóis, o impacto do α -tocopherol na prevenção de doenças crônicas, que se pensa estarem associadas ao *stress* oxidativo, tem sido extensivamente estudado e os seus efeitos benéficos têm sido demonstrados. As observações de que a proteína específica α -TTP tem a capacidade de diferenciar RRR- α -tocopherol das restantes formas da vitamina E, para a incorporação em lipoproteínas do plasma e que o α -tocopherol tem funções de sinalização nas células de músculo liso vascular, que não podem ser exercidas pelas outras formas do tocoferol com propriedades antioxidantes semelhantes, despertaram o interesse dos investigadores para as funções da vitamina E, para além da sua já conhecida função antioxidante (Brigelius-Flohé & Traber, 1999).

Os alimentos que possuem alto teor de gordura, como o leite e a margarina, ou aqueles que são comumente ingeridos com outros alimentos ricos em gordura, podem ser, preferencialmente, fortificados com vitamina E, por propiciarem maior absorção desse nutriente. A vitamina E apresenta efeitos positivos, tanto para a saúde humana quanto para a qualidade nutricional dos alimentos e a sua utilização na indústria alimentar como antioxidante, parece ser uma estratégia eficaz para o aumento da ingestão diária desse micronutriente (Batista *et al.*, 2007).

2.4 Radicais livres na Doença de *Alzheimer*

A doença de *Alzheimer* (DA) pode ser definida como uma doença neurodegenerativa irreversível, clinicamente caracterizada por uma perda progressiva das capacidades cognitivas e motoras (Grabowski & Damasio, 1998; Blennow *et al.*, 2006; Yaari *et al.*, 2007). O primeiro caso desta neuropatologia foi descrito há mais de 100 anos por Aloys Alzheimer, que estudou o cérebro de uma paciente, que morrera de uma estranha doença mental e identificou a presença de placas senis e neurofibrilas no cérebro (Jellinger, 2006).

O aumento da esperança média de vida que se verifica em inúmeros países, leva a que este tipo de demência se torne um problema de saúde de grande importância para a sociedade (Grabowski & Damasio, 1998; Cruz *et al.*, 2004; Burns & Iliffe, 2009). A sua incidência aumenta exponencialmente com a idade, constituindo a 4ª causa de morte em pessoas com idade superior a 65 anos nos países desenvolvidos (Jellinger, 2006). Num estudo de 2006 estimou-se que cerca de 7-8 milhões de pessoas na Europa e 4-5 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América sofriam desta patologia e que o número de indivíduos deveria atingir 14 e 16 milhões, respetivamente, em 2050 com o aumento da esperança média de vida. Em Portugal, estima-se que esta doença afeta mais de 70 000 indivíduos (Jellinger, 2006). Embora haja tratamentos que ajudem a aliviar os sintomas, a cura para a DA permanece ainda desconhecida. Contudo, esta doença neurodegenerativa continua a ser um grande alvo da investigação científica, na tentativa de se desenvolverem vias de prevenção e tratamento (Blennow *et al.*, 2006; Jellinger, 2006).

Esta doença neurodegenerativa é caracterizada patologicamente pela morte dos neurónios e a perda de conexões sinápticas em regiões específicas do cérebro, agregação e deposição extracelular de proteína β -amilóide com consequente formação de placas amilóides, e pela precipitação intracelular de proteína Tau hiperfosforilada, responsável pela formação dos emaranhados neurofibrilares intraneurais (Ricciarelli *et al.*, 2007; Cardoso & Cozzolino, 2009)

Inicialmente partia-se do princípio que as placas amilóides e os emaranhados de neurofibrilas seriam a causa do dano e morte celular e consequentemente do défice cognitivo. Esta hipótese (amilóide) tem vindo a ser alvo de grande debate e de constantes modificações, no entanto, diversos estudos têm demonstrado que outras vias de dano poderiam ser a causa da sua formação, não se conseguindo determinar quais os fatores desencadeadores desta doença (Karran *et al.*, 2011).

Outros estudos têm tentado estabelecer uma ligação entre doentes com esta patologia e certos compostos nutricionais, entre os quais as vitaminas antioxidantes, vitaminas do complexo B e ácidos gordos insaturados ómega-3. Geralmente, estes doentes apresentam deficiências nutricionais específicas, nomeadamente nos compostos já referidos. Desta forma, a baixa ingestão destes nutrientes tem sido associada a um maior risco de desenvolvimento da DA (Van der Beek & Kamphuis, 2008).

Múltiplos são os estudos que têm vindo a relatar várias hipóteses para o seu desenvolvimento, progressão e severidade, destacando-se a hipótese amilóide, a neuroinflamação, alterações da homeostasia do cálcio, a colinérgica e o *stress* oxidativo (Ballard *et al.*, 2011).

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres por apresentar alto consumo de oxigênio, por possuir grande quantidade de ácidos gordos polinsaturados e reduzido nível de enzimas antioxidantes, quando comparado a outros tecidos. Desta forma e com o avanço da idade, o cérebro sofre mudanças morfológicas e funcionais, afetando as árvores de dendrites e sinapses, neurotransmissão, circulação e metabolismo, alterando o sistema motor e sensorial e de memória. Além disso, existe uma tendência a aumentar as reações que produzem ROS, paralelamente a uma diminuição dos processos que defendem o organismo de moléculas reativas (Cardoso & Cozzolino, 2009).

Em pacientes com DA, têm-se evidenciado danos provocados por um aumento de radicais livres, constatados pela presença da peroxidação lipídica e de danos oxidativos na mitocôndria e no DNA. Vários estudos descrevem o papel que os radicais livres possuem nesta doença. Estes podem provocar alterações na homeostase dos níveis de Ca^{2+} no sistema nervoso central, através da lipoperoxidação, que leva a um aumento destes iões, danificando diretamente as bombas de Ca^{2+} . As alterações na homeostasia do cálcio (importante na regulação de enzimas do ácido cítrico) podem, também, levar à inibição da produção de adenosina 5-fosfato (ATP) que danifica indiretamente as bombas de Ca^{2+} . Vários estudos sugerem a interferência das ROS na atividade de enzimas glicolíticas que podem provocar anomalias nos metabolismos energéticos. Os radicais livres podem induzir a agregação de proteínas β -amilóides, através de um decréscimo do metabolismo da glucose ou da atividade da proteína cinase C (PKC). Desta forma, as alterações a nível do metabolismo energético da mitocôndria e da enzima PKC, induzidas pelos radicais, levam à agregação de proteínas β -amilóides (Ying, 1996).

Os radicais livres têm vindo a demonstrar um importante papel no desenvolvimento e progressão da DA, influenciando vários processos, como a transdução de sinal, a partir dos níveis de Ca^{2+} e glucose, anormalidades em enzimas importantes como a glutamina sintase e a enzima PKC e alterações a nível da expressão de genes. Todos estes fatores contribuem para a neurodegeneração (Ying, 1996; Ricciarelli *et al.*, 2007).

2.5 Métodos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. É fundamentada na migração diferencial dos componentes dessa mistura, que ocorre devido às diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária.

De acordo com a IUPAC a cromatografia é usada para a separação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase móvel é um fluido que percorre a fase estacionária e que consigo arrasta os compostos para que sejam separados. São correntemente utilizados três tipos de fluidos: líquido, gás e supercrítico. E também uma variedade de fases estacionárias, incluindo sílica imobilizada em placas de vidro, gases voláteis, papel e líquidos (Degani *et al.*, 1998).

O princípio básico da cromatografia consiste na passagem dos componentes da amostra através de um meio com o qual interagem, a fase estacionária, sendo arrastados por um fluido, a fase móvel. Todas as cromatografias são baseadas num tempo de retenção ou num tempo de permanência diferente para os vários solutos. A separação é permitida devido às diferenças na estrutura e ou composições das moléculas, ou seja, as moléculas da amostra possuem diferentes afinidades e interações com a fase estacionária, conduzindo à separação de moléculas. Os componentes da amostra que exibam interações mais fortes com a fase estacionária irão mover-se mais lentamente através da coluna, do que os componentes com interações mais fracas. Assim, os diferentes compostos podem ser separados à medida que se movem através da coluna (Kupiec, 2004).

O termo cromatografia foi empregue pela primeira vez em 1906, pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, ao descrever as suas experiências na separação de pigmentos de cloroplastos em extratos de folhas. Nesse estudo, utilizou uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio, como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, o que levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), embora o processo não dependa da cor. Mikhael Semenovich Tswett foi então, o primeiro a compreender e a interpretar este processo tal como é atualmente conhecido, sendo-lhe atribuída a descoberta da cromatografia. Apesar deste estudo, a cromatografia foi ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna (Degani *et al.*, 1998). Em 1941 Martin e Synge pretenderam separar aminoácidos da lã por extração em contra-corrente, mas sem sucesso. Desenvolveram, então, a cromatografia de partição e foi em 1952 que receberam o Prémio Nobel devido ao trabalho que desenvolveram em cromatografia de partição líquido-líquido.

Ao longo dos anos foram desenvolvidos vários métodos cromatográficos e hoje em dia com os avanços tecnológicos, a cromatografia foi levada a um grau superior de sofisticação, do qual resultou o seu grande potencial de aplicação em muitas áreas.

Na figura 2.11 é possível visualizar os métodos cromatográficos mais importantes.

A cromatografia pode ser utilizada na purificação de compostos separando-os de substâncias indesejáveis, identificação de compostos e na separação dos componentes de uma mistura. A variedade de cromatografias é notória e como tal, as suas classificações também são diversas e apoiam-se em diferentes critérios. Os esquemas de classificação mais usuais estão relacionados com a forma física do sistema e com a natureza da fase móvel (Degani *et al.*, 1998).

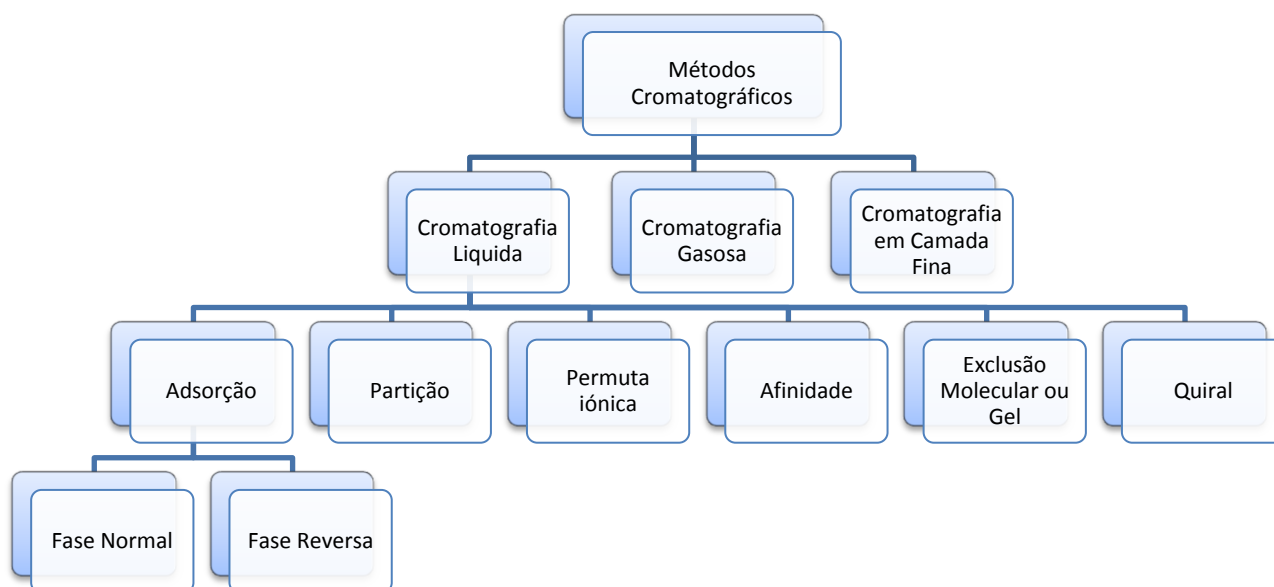


Figura 2.11 Diferentes métodos cromatográficos.

Em relação à forma física do sistema, a cromatografia está subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. Na cromatografia em coluna a fase estacionária encontra-se dentro de uma coluna e a fase móvel passa através da coluna ou sob pressão ou sob a força da gravidade. Na cromatografia em coluna podemos encontrar a cromatografia líquida, gasosa ou de fluídos super-críticos. Tanto a cromatografia líquida como a gasosa ainda podem ser classificadas quanto à natureza da fase estacionária e quanto ao tipo

de equilíbrio entre as duas fases. A cromatografia planar refere-se à cromatografia em papel, à cromatografia por centrifugação e à cromatografia em camada fina.

A cromatografia líquida apresenta uma importante subdivisão: a cromatografia líquida clássica, na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência, na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. Para o caso das fases móveis gasosas, as separações podem ser obtidas por cromatografia gasosa e por cromatografia gasosa de alta resolução. Na cromatografia de alta resolução são utilizadas colunas capilares, enquanto a cromatografia gasosa clássica utiliza colunas de maior diâmetro empacotadas com a fase estacionária (Degani *et al.*, 1998).

Para a validação da metodologia, a cromatografia utilizada no presente trabalho, será a cromatografia líquida de alta eficiência e como tal irei debruçar-me um pouco mais sobre esta, em relação às outras.

A cromatografia líquida envolve a injeção de um pequeno volume de amostra líquida num tubo cheio de partículas porosas, fase estacionária, onde os componentes individuais da amostra são transportados ao longo do tubo de enchimento, a coluna, por um líquido movido pela força da gravidade, a fase móvel. A separação ocorre porque, dentro de um conjunto ótimo de condições, cada componente da mistura irá interagir física e quimicamente com as duas fases de um modo diferente, em relação aos outros componentes dessa mistura. Os componentes separados são recolhidos à saída da coluna e identificados através de um dispositivo, detetor, que mede o seu valor (Agilent Technologies, 2013).

Com o avanço da cromatografia em coluna, desenvolveu-se a utilização de suportes com partículas menores responsáveis por uma melhor eficiência e como tal tornou-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, assim apareceu a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês HPLC, *High Performance Liquid Chromatography* (Degani *et al.*, 1998). Esta e a cromatografia líquida clássica funcionam do mesmo modo, no entanto, a velocidade, eficiência, sensibilidade e facilidade de operação da cromatografia líquida de alta eficiência é muito superior (Ferreira, 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência é o tipo mais versátil e mais amplamente usado de cromatografia líquida. Essa técnica é utilizada pelos químicos para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. O tipo de cromatografia líquida de alta eficiência é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Com esta abordagem a cromatografia líquida pode ser subdividida em cromatografia de partição ou cromatografia

líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, permuta iônica, exclusão molecular e afinidade (Skoog *et al.*, 2006).

Graças aos enormes avanços que têm sido realizados nos últimos anos, a cromatografia líquida pode ser subdividida em mais um mecanismo de retenção. Este mecanismo permite a separação de compostos enantioméricos, ao qual se designa, cromatografia quiral. Esta possibilita a separação direta de enantiômeros, através de aditivos na fase móvel ou de fases estacionárias quirais. A complexação preferencial entre o agente de resolução quiral (aditivo ou fase estacionária) e um dos isômeros resulta na separação dos enantiômeros (Degani *et al.*, 1998; Skoog *et al.*, 2006).

Na cromatografia de adsorção a fase móvel, líquida, é constituída geralmente por um solvente orgânico ou por uma mistura de solventes orgânicos e a fase estacionária, sólida, é composta por partículas finamente divididas de sílica ou alumina (Skoog *et al.*, 2006).

Os analitos interagem com a fase estacionária de acordo com a premissa “igual com igual”, onde o soluto polar é retido mais tempo por uma fase estacionária polar e solutos não polares, são melhor retidos por fases estacionárias não polares. Assim, a separação é baseada nas diferenças de afinidade dos componentes da amostra pela superfície da fase estacionária (Ferreira, 2013).

Quando a afinidade é entre compostos polares, diz-se que a cromatografia é de fase normal. Neste sistema cromatográfico, onde a fase estacionária é polar e a fase móvel menos polar, quanto maior é a polaridade do soluto, maior a retenção na coluna, assim sendo, os compostos apolares são os primeiros a serem eluídos. Por sua vez a cromatografia em fase reversa é, tal como o nome sugere, o inverso de cromatografia de fase normal no sentido em que envolve a utilização de uma fase estacionária apolar e uma fase móvel moderadamente polar (mistura de uma solução aquosa e um solvente orgânico, como metanol e acetonitrilo). Assim, são primeiramente eluídos os compostos polares, ficando os apolares retidos na coluna. Esta cromatografia é a mais amplamente utilizada devido aos compostos analisados serem maioritariamente polares e altamente solúveis em água (Skoog *et al.*, 2006; Burri, 2007; Ferreira, 2013).



Figura 2.12 Aparelho de HPLC da marca Agilent Technologies (Fonte: Agilent Technologies, 2013).

Os componentes básicos de um instrumento de HPLC são o eluente, os recipientes para a fase móvel, uma bomba para deslocar o eluente e a amostra através do sistema, um dispositivo de injeção para permitir a introdução da amostra, uma coluna para proporcionar a separação de solutos, um detetor para visualizar a separação dos componentes, um recipiente para o solvente utilizado e um dispositivo de recolha de dados para a interpretação e armazenamento dos resultados (Figura 2.12) (Weston & Brown, 1997).

As bombas são a peça de equipamento mais crítica para o sucesso da cromatografia líquida de alta eficiência. As bombas de alta pressão são necessárias para fazer eluir a fase móvel através da fase estacionária, com um caudal específico, expresso em mililitros por minuto, que pode variar entre 0,1 mL/min a 5,0 ou 10,0 mL/min e pode ser estabelecido em quaisquer valores em intervalos de 0,1 mL/min. Este equipamento deve ser capaz de gerar altas pressões (350 bar ou até mesmo 500 bar) e deve ter a exatidão a elevado fluxo e precisão a qualquer caudal escolhido.

Os injetores automáticos contêm uma versão mecanicamente acionada da válvula de seis vias encontrada em injetores manuais. A válvula de injeção típica é a válvula de seis vias,

que possui duas posições: a posição de carga e a posição de injeção. Para introduzir a amostra, a válvula é ligada pela primeira vez para a posição de carga, nessa posição, a fase móvel ultrapassa o *loop* de amostra e flui diretamente a partir da bomba para a coluna. Ao mesmo tempo, a amostra é introduzida no *loop* de amostra através do orifício da agulha, sem interromper o fluxo de eluente. Para introduzir a amostra no cromatógrafo, a válvula é ligada para a posição de injeção e a fase móvel é utilizada para impulsionar a amostra para a coluna. Nos injetores automáticos a amostra é introduzida automaticamente a partir dos *vials* (frascos que contém a amostra preparada para a análise) que se encontram num suporte com poços onde estes se colocam.

A coluna é considerada o “coração do cromatógrafo”, pois é esta que permite separar os componentes de uma mistura. A seletividade, capacidade e eficiência da coluna são afetados pelo material de enchimento da coluna ou material de construção. Os enchimentos mais modernos de HPLC são micropartículas de vários tamanhos, formas e porosidades. A superfície das partículas pode ser modificada em qualquer meio físico ou químico de modo a permitir o acesso a qualquer tipo de cromatografia clássica. A sílica em gel é a principal fase estacionária para a cromatografia de adsorção, pois é abundante, barata e disponível numa grande variedade de formas, tamanhos e porosidade.

O detetor monitoriza a luz que passa através do eluente, ou seja, quando um composto de absorção de UV se dissolve no eluente, este passa através do detetor que absorve uma parte da luz. A concentração de soluto e a intensidade da luz transmitida através da célula de fluxo estão relacionadas de acordo com a lei de Lambert-Beer: $A = \epsilon cd$, onde ϵ representa a absorvidade molar, c a concentração molar e d o comprimento da célula. Quanto maior for a concentração de soluto, maior será o sinal da amostra.

O processador de dados, não só controla todos os módulos do aparelho de HPLC, como também converte o sinal do detetor e usa-o para determinar o tempo de eluição (tempo de retenção) dos componentes da amostra (análise qualitativa) e a quantidade de amostra (análise quantitativa), apresentando o sinal em forma de cromatograma.

2.6 Extração e quantificação de vitamina E

Os processos de extração da vitamina E incluem a esterificação, saponificação, extração líquido-líquido, cristalização, destilação e cromatografias de adsorção e troca de iões. Estes processos são, normalmente, utilizados em combinação, para produzir as maiores e as mais puras frações de vitamina E (Quek *et al.*, 2007).

De entre os métodos químicos usados para identificação e quantificação de tocoferóis, a cromatografia líquida de alta eficiência é o mais comum, pois consiste num método simples que apresenta poucas dificuldades técnicas. Desta forma, permite que um cientista que trabalhe num pequeno laboratório, com um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência antigo e um detetor de comprimento de onda ultravioleta de baixo custo, consiga quantificar tocoferóis na análise de amostras alimentares e obter excelentes resultados (Burri, 2007). Os métodos analíticos que recorrem ao HPLC são vários e nestes podemos encontrar HPLC de fase normal ou reversa, com eluições isocráticas ou de gradiente e com acoplamento de detetores de UV e ou de fluorescência (Paixão & Stamford, 2004; Burri, 2007). Na competição da fase normal com a fase reversa, a segunda oferece certas vantagens práticas, tais como, maior estabilidade da coluna, reprodutibilidade dos tempos de retenção, equilíbrio mais rápido e menor tempo de análise, sendo que os sistemas de solventes da fase reversa preservam mais o ambiente, do que os utilizados na fase normal (Gimeno *et al.*, 2000a,b).

A remoção inicial dos componentes lipídicos dos alimentos é o primeiro passo na concentração da vitamina, pois estes são componentes maioritários nos alimentos. A sua remoção é normalmente conseguida por meio de esterificação e saponificação, seguidas da destilação dos ésteres alquila e da remoção dos sais de ácidos gordos, respetivamente. Os processos de extração líquido-líquido e cristalização também são utilizados para remover os componentes lipídicos (Quek *et al.*, 2007). A fração obtida após os processos de extração contém, normalmente, as substâncias insaponificáveis. Entre estas encontram-se tocoferóis, carotenóides, retinóis, esteróis, esqualeno, hidrocarbonetos e ceras, em proporções variadas dependendo das condições de saponificação e extração (Salo-Väänänen *et al.*, 2000; Paixão & Stamford, 2004; Quek *et al.*, 2007). As etapas seguintes são focadas na separação da vitamina E das substâncias insaponificáveis e processos, tais como, métodos cromatográficos, destilação molecular, cristalização e extração líquido-líquido, são geralmente utilizados para este propósito (Quek *et al.*, 2007).

A saponificação seguida de extração é o método de preparação de amostra mais amplamente utilizado para as vitaminas lipossolúveis em amostras de alimentos. O método de saponificação pode ser otimizado através da afinação de determinados fatores, tais como, o tamanho da amostra, concentração de hidróxido de potássio em solução, a temperatura e tempo de saponificação, a composição da solução antes da saponificação e os solventes de

extração. A seleção de um antioxidante e a remoção de oxigénio por azoto são também importantes neste processo (Salo-Väänänen *et al.*, 2000)

Em 1944, Hickman patenteou o melhoramento do processo de purificação de substâncias da natureza do tocoferol. Este diz que a sua invenção tem como objetivo proporcionar um método simples, barato e eficiente de isolar valiosas substâncias antioxidantes e terapêuticas da natureza dos tocoferóis, a partir de produtos voláteis derivados de óleos vegetais ou animais. O processo de extração utilizado por Hickman é a saponificação. Nesta, à amostra a quantificar é adicionado uma base, preferencialmente hidróxido de potássio, em quantidade suficiente para saponificar ácidos gordos e glicéridos presentes na amostra. A mistura é submetida a refluxo, em que um banho de vapor é um método conveniente de aquecimento, durante cerca de uma hora, tempo até que a reação esteja substancialmente completa. A mistura saponificada é então extraída com várias porções de um solvente, tal como o éter etílico ou o éter de petróleo. Esta porção é lavada com água, para remover os sabões, é seca e o solvente destilado. O resíduo não destilado constitui um produto de tocoferol relativamente concentrado. No entanto, este ainda contém esteróis, que podem ser facilmente removidos por dissolução num solvente, tal como o álcool metílico, formato de etilo ou acetato de etilo e refrigerados a baixa temperatura até que os esteróis precipitem. Posteriormente o solvente é removido por destilação (Hickman, 1944).

Indyk, em 1988 avalia uma abordagem simplificada de quantificação de tocoferóis, numa gama variada de amostras, tais como, leite em pó, formulas para bebés, fígado liofilizado, peixe, leite, manteiga derretida, margarina e óleos vegetais, envolvendo o processo de saponificação e quantificação por HPLC de fase normal ou reversa. As amostras foram pesadas, em quantidades especificadas no estudo e introduzidas em tubos de ensaios, aos quais se adicionou, sob agitação, etanol contendo pirogalol (1% m/V) e uma solução de hidróxido de potássio (50% m/V). Os tubos tapados foram incubados a 70°C durante 7 minutos. Depois de arrefecidos adicionou-se o solvente de extração composto por éter petróleo e éter diisopropílico (3+1), os tubos foram tapados e agitados durante 5 minutos. Posteriormente adicionou-se água e os tubos foram re-tapados, invertidos 10 vezes e centrifugados durante 10 minutos. Uma alíquota da fase superior foi injetada diretamente no aparelho de HPLC. De acordo com a validação efetuada o tocoferol é recuperado de forma adequada (94,8%) com coeficiente de variação de 3,8% (Indyk, 1988).

O método desenvolvido por Panfili, na década de 90, envolvia a quantificação simultânea de tocoferóis, carotenos e retinóis, em queijo italiano, por HPLC de fase normal. À amostra a analisar foram adicionados os seguintes reagentes, etanol (95%), solução de hidróxido de potássio (60%), solução de cloreto de sódio (1%) e solução de etanol pirogalol (6%) e posteriormente uma corrente de azoto para remover o oxigénio do *headspace* do recipiente onde se encontrava a mistura. A digestão alcalina foi realizada num banho de água a

70°C durante 30 minutos. Após arrefecimento, foi adicionada uma solução de cloreto de sódio (1%) para prevenir a emulsificação. A suspensão foi extraída duas vezes com o solvente n-hexano/acetato de etilo (9+1) e após recolhidas as fases orgânicas, esta foi evaporada e o resíduo seco dissolvido em 2mL da fase móvel (Panfili *et al.*, 1994).

Já no século XXI, foram publicados, curiosamente pelo mesmo autor, dois métodos bastantes diferentes de quantificação de tocoferóis de óleos vegetais usando HPLC de fase reversa.

O primeiro método, que vou referir, é bastante simples pois não necessita de saponificação, ou seja, não é necessária a extração prévia do tocoferol. Segundo o autor, vários estudos de HPLC de fase reversa têm sido relatados, no entanto, estes envolvem processos de saponificação que implicam extrações com solventes, secagens e passos de concentração e como os tocoferóis são sensíveis à luz e ao ar e os processos requerem muitas manipulações, estes podem resultar na degradação parcial destes antioxidantes. Desta forma, a preparação da amostra é o passo fundamental da análise. Por esse motivo, Gimeno e colaboradores desenvolveram um método experimental, usando HLC de fase reversa com detetor de UV, em que não é necessário qualquer processo de extração. O óleo é diluído em n-hexano (1+10) e uma alíquota deste é transferido para um recipiente apropriado, onde é adicionado uma pequena quantidade de metanol contendo o padrão. Após centrifugação, a amostra é filtrada e injetada diretamente no aparelho de HPLC (Gimeno *et al.*, 2000a). Também o método de Swiglo & Sikorska, anos depois, é desenvolvido, usando HPLC de fase reversa, sem recorrer a processos de saponificação. As amostras de azeite, milho, amendoim, uva, canola, girassol e soja são pesadas e dissolvidas em 2-propanol. Após agitação, são diretamente injetadas no aparelho de HPLC, sem tratamento adicional da amostra. (Swiglo & Sikorska, 2004).

O outro método publicado por Gimeno e colaboradores consiste na determinação simultânea de α -tocoferol e β -caroteno em azeite de oliva virgem, usando HPLC de fase reversa. Neste procedimento, ao contrário do estudo mencionado acima, foi realizado a saponificação da amostra seguida da extração com uma mistura de n-hexano e acetato de etilo (85:15 v/v). O processo consiste na adição de ácido ascórbico (10,5 mg/mL), etanol e uma solução de hidróxido de potássio (76%), sob uma corrente de azoto, a um recipiente apropriado que contem a amostra. Este foi incubado a 70°C durante 30 minutos com agitação constante. Posteriormente adicionou-se cloreto de sódio (25 g/L) e a suspensão foi extraída 3 vezes com uma mistura de n-hexano/acetato de etilo. A fase orgânica foi evaporada à temperatura de 40°C e o resíduo dissolvido em metanol. Esta solução depois de passada por um filtro de 0,45 μ m foi diretamente injetada no aparelho de cromatografia. Com este método, o autor conseguiu comprovar que, mesmo incluindo um processo de saponificação, este método consente uma rápida e completa determinação de tocoferol (Gimeno *et al.*, 2000b).

A determinação de tocoferóis em produtos de origem animal, nomeadamente no leite, envolve saponificação e é bastante idêntica a alguns métodos já referidos. Segundo Salo-Väänänen e colaboradores, a amostra foi pesada para um tubo e foram adicionados etanol, pirogallol, ácido ascórbico, EDTA saturado e uma solução de hidróxido de potássio (0,5 g/mL). O tubo foi tapado, agitado e transferido para um banho de água a ferver durante 20 minutos. Depois de arrefecido foi adicionado, em duas vezes, água e o solvente de extração n-hexano/acetato de etilo (8+2), de forma a extrair as vitaminas lipossolúveis. O tubo foi agitado e após separação das fases, a camada orgânica foi evaporada com azoto (30°C) e o resíduo seco foi dissolvido em n-hexano. A amostra foi filtrada e introduzida no HPLC, para quantificação em fase normal com detetor de fluorescência (Salo-Väänänen *et al.*, 2000).

Para alimentos à base de cereais, um método rápido de determinação de tocoferóis, também foi desenvolvido. Este envolve a saponificação da amostra e extração da vitamina, seguida da sua quantificação por HPLC de fase normal. A saponificação foi efetuada segundo o método validado pelo mesmo autor no ano de 1994, para amostras de queijo italiano. Este método foi comparado com outros de extração direta sem saponificação e os resultados são positivos (Panfili *et al.*, 2003).

Lim e colaboradores compararam diferentes métodos de extração para a determinação de tocoferóis em amostras de soja, usando HPLC de fase normal, de modo a identificar qual o mais eficaz. Para a mesma amostra, realizaram três processos de extração diferentes, sendo estes a saponificação, a extração por *Soxhlet* e a extração direta por solvente. O método de extração por saponificação foi realizado da seguinte maneira: à amostra a analisar foi adicionado etanol contendo pirogallol (6%), solução de hidróxido de potássio (60%) e o tubo fechado sob uma corrente de azoto. Após ficar num banho água sob agitação a 70°C durante 50 minutos e consequente arrefecimento, foi adicionado uma solução de cloreto de sódio (2%) e a mistura foi extraída 3 vezes com o solvente n-hexano/acetato de etilo (85:15 v/v) contendo BHT (0,01%). Os extratos foram recolhidos e diluídos para um volume específico, filtrados e injetados no HPLC. Após realização dos três métodos a comparação foi feita e o método de extração por *Soxhlet* provou ser o melhor método para a quantificação de tocoferóis em amostras de soja, sendo mais eficaz que a saponificação que é amplamente utilizada para extrair tocoferóis em amostras de alimentos (Lim *et al.*, 2007). No entanto, anos mais tarde, Slavin & Yu consideram a saponificação como o método de extração de vitamina E de amostras de soja (Slavin & Yu, 2012).

Schwartz e colaboradores desenvolveram em 2008, um método de determinação de vitamina E de 14 vegetais e 9 gorduras industriais, usando HPLC de fase normal com detetor de fluorescência. Neste procedimento, as margarinas e outras gorduras foram submetidas a saponificação na presença de ácido ascórbico (11,7 mg/mL), solução saturada de hidróxido de potássio e etanol, sob agitação durante 30 minutos a 85°C. Posteriormente realizou-se a

extração, três vezes repetida, com o solvente de éter dietílico/heptano (50:50 v/v). Os extratos orgânicos foram lavados com uma solução de cloreto de sódio (10%), água e ácido clorídrico 0,01 M. Estes foram secos em sulfato de sódio anidro e evaporados à temperatura de 30°C. O resíduo sólido dissolvido em heptano e a solução filtrada antes de ser analisada no equipamento de HPLC (Schwartz *et al.*, 2008)

Como anteriormente referido, os tocoferóis são sensíveis à luz e ao ar e os processos que requerem muitas manipulações podem resultar na degradação parcial destes antioxidantes (Gimeno *et al.*, 2000a), no entanto, a saponificação seguida de extração é o método de preparação mais amplamente utilizado para as vitaminas lipossolúveis em amostras de alimentos (Salo-Väänänen *et al.*, 2000). Considerando a preparação da amostra como o passo fundamental da análise (Gimeno *et al.*, 2000a), é importante ter em conta diversos fatores quando se realiza a saponificação, como, o tamanho da amostra, concentração de hidróxido de potássio em solução, a temperatura e tempo de saponificação, a composição da solução antes da saponificação e os solventes de extração (Salo-Väänänen *et al.*, 2000).

3. CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

3.1 SGS – Sociedade Geral de Superintendência, S.A.

A empresa SGS foi fundada em 1878, na cidade de Rouen em França, como um entreposto Francês para a inspeção do comércio internacional de cereais a granel. Após 41 anos, foi registada como *Société Générale de Surveillance* na cidade de Genebra e atualmente é a maior organização mundial no domínio da inspeção, verificação, análise e certificação. Esta conquista é conseguida através de melhorias e inovações contínuas e através do apoio às operações dos seus clientes, reduzindo os riscos e aumentando a produtividade.

A marca global da SGS está estabelecida como um símbolo de referência na prestação de serviços de excelência e estará sempre associada a valores como a independência, a integridade, a confidencialidade e a inovação (Figura 3.1). Atualmente presente em cerca de 140 países, a SGS opera em mais de 1650 escritórios e laboratórios, contando com 80000 colaboradores em todo o mundo.



Figura 3.1 Logotipo de slogan da empresa SGS, S.A.

Em Portugal foi fundada em 1922 pelo grupo SGS que estabeleceu que esta afiliada desenvolvesse a sua atividade pelos mesmos princípios geradores da ação do próprio grupo: a independência, a integridade, a confidencialidade e a inovação.

A SGS Portugal possui laboratórios acreditados (ISO 17025) nas áreas agroalimentar, detergentes e produtos de higiene, cosméticos, dispositivos médicos, ensaios não destrutivos, ambiental e segurança ocupacional e os serviços hoje em dia prestados abrangem análises, ensaios, verificações metrológicas acreditadas, inspeções e auditorias técnicas nos mais diversos ramos. A SGS é uma empresa multicultural, em que os colaboradores das várias

afiliadas partilham conhecimentos e experiências, por forma a reunir várias competências para encontrar as melhores soluções para os seus clientes e parceiros empresariais.

O laboratório alimentar da SGS Portugal, que se encontra no Lumiar, no Polo Tecnológico, é composto pela sala de receção de amostras, laboratório de química e laboratório de microbiologia onde foi inserido o estágio. Atualmente, o laboratório de Química da SGS tem apostado no desenvolvimento e na implementação de metodologias de química instrumental, nomeadamente espectroscopia de absorção atómica e métodos cromatográficos. O estágio curricular teve como fim continuar a expansão na área de trabalho referida anteriormente, sendo o principal objetivo a implementação e validação de uma metodologia associada à cromatografia líquida de alta eficiência.

4. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Introdução

O desenvolvimento da metodologia para a quantificação da vitamina E em manteiga por HPLC, decorreu no laboratório de Química da SGS – Sociedade Geral de Superintendência S.A., em Lisboa. Como tal utilizou-se os equipamentos e materiais disponíveis nestas instalações. Para o desenvolvimento da metodologia analítica, foram realizadas experiências preliminares que levaram à seleção dos parâmetros mais adequados para esse fim.

4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos estudos preliminares e na implementação e validação do método de pesquisa e quantificação de vitamina E por HPLC são:

- Água Milli-Q da Millipore
- DL- α -tocoferol da Supelco
- Etanol 95% da Aga
- Éter de Petróleo da Sigma-Aldrich
- Éter Dietílico da Sigma-Aldrich
- Metanol (*for HPLC-GOLD-ultragradient*) da Carlo Erba
- n-Hexano da Sigma-Aldrich
- Sulfato de sódio Anidro da Carlo Erba
- Ascorbato de Sódio da Fagron
- Hidróxido de Potássio da Akzo Nobel Eka Chemicals

E as soluções utilizadas são as seguintes:

- Solução de ascorbato de sódio: Dissolver 100 g de ascorbato de sódio em água, para um balão volumétrico de 1 L. Transferir o conteúdo para uma garrafa de vidro âmbar e conservar no frigorífico.
- Solução de hidróxido de potássio: Dissolver 500 g de hidróxido de potássio em água. Deixar arrefecer e perfazer o volume para um balão volumétrico de 1 L.
- Solução do solvente de extração: Adicionar a um balão volumétrico de 1 L, 700 mL de éter de petróleo e 300 mL de éter dietílico.

4.3 Material

No decorrer deste trabalho foram utilizados os materiais correntes do laboratório:

- Ampolas de decantação de 250 mL
- Balões de fundo chato com boca esmerilada de 250 mL
- Balões de fundo redondo com boca esmerilada de 250 mL
- Balões volumétricos de 20, 25, 500 mL e 1 L
- Condensador de refluxo
- Filtros 0,45 µm
- Funis
- Garrafa de vidro âmbar de 500 mL e 1 L
- Papel de filtro
- Pipetas volumétricas
- Pipetas de Pasteur descartáveis
- Provetas
- Reguladores de ebulição
- *Vials*

4.4 Equipamento

No decorrer deste trabalho foram utilizados os equipamentos correntes do laboratório.

- Balança analítica com precisão $\pm 0,10$ mg, Mettler, modelo AE200
- Coluna cromatográfica, Zorbax Eclipse Plus C18 de 4,6 x 100 mm de 3,5 µm
- Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, detetor UV, injeção automática e sistema de aquisição de dados
- Evaporador rotativo, Nahita 503, 200V, 50-60Hz, 1000W, 10-90 rpm
- Placa aquecimento, P Selecta

4.5 Preparação de Soluções

- **Fase móvel**

A fase móvel é constituída por metanol e água ultra pura, nas proporções 95:5 (v/v) respetivamente.

- **Solução mãe de DL- α -tocoferol (100,0 mg/L)**

Pesar rigorosamente 50,00 mg do padrão α -tocoferol, dissolver em metanol de HPLC e transferir para um balão volumétrico de 500 mL. Transferir a solução para uma garrafa de vidro âmbar e conservar no frigorífico.

- **Soluções Padrão**

Pipetar 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL de solução mãe para balões volumétricos de 20 mL e dissolver em metanol para HPLC, para obter as concentrações de 5,00, 10,00, 20,00, 30,00, 40,00 e 50,00 mg/L.

4.6 Estudos preliminares

O primeiro contacto experimental para a validação deste método teve como suporte a ISO 6867:2000 bem como a validação de um método de determinação da vitamina E expressa em α -tocoferol em alimentos para animais, realizada por Rachieru e colaboradores, em 2009.

A primeira determinação de vitamina E foi realizada sob uma amostra de ração para animais, tal como as amostras cuja validação de Rachieru se incidiu. No entanto, numa fase inicial, sem conhecer a concentração real de vitamina E, a validação deste método seria dificultada. Desta forma, os estudos preliminares desta validação foram realizados numa amostra de manteiga, cuja concentração em vitamina E era conhecida, não só pelo valor rotulado como também pelo valor calculado por um laboratório externo, possibilitando assim perceber se este método seria ou não adequado.

Para cada ensaio realizado é necessário fortificar uma amostra de modo a garantir que possíveis interferências de matriz não interferem na deteção do analito. Um ensaio apenas é considerado válido se a percentagem de recuperação relativamente à amostra fortificada for $100 \pm 20\%$. O procedimento para a amostra fortificada é realizado tal como para as amostras sujeitas a quantificação, mas estas são sujeitas à adição de um padrão em concentração conhecida. Na presente metodologia adiciona-se 1,25 mL da solução mãe (100,0 mg/L) logo após a pesagem da amostra no balão de 250 mL. Deste modo sabe-se que se fortificou a amostra com 5,00 mg/L de vitamina E.

Para o método a validar os processos de extração de vitamina E, consistem na saponificação da amostra, seguido da extração líquido-líquido da vitamina E. Posteriormente é quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência.

A um balão de 250 mL de fundo chato com boca esmerilada adicionar:

- 10 g da amostra preparada
- 40 mL etanol (95%) com agitação para dispersar a amostra
- 0,5 mL da solução de ascorbato de sódio e agitar
- 10 mL da solução de hidróxido de potássio e agitar
- Reguladores de ebulição

Colocar o balão esmerilado sob uma placa de aquecimento com um condensador de refluxo e deixar refluxar por 30 minutos.

Transferir o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 250 mL. Para lavar o balão adicionar: 2 porções de 5 mL de etanol; 2 porções de 25 mL de éter de petróleo e por último 50 mL de água. A cada lavagem transferir o conteúdo para a ampola de decantação.

Colocar a tampa na ampola de decantação, agitar vigorosamente durante 1 minuto e aliviar a pressão. Aguardar enquanto se forma a separação de fases, depois retirar a tampa e lava-la com poucos mL de éter de petróleo.

Transferir a fase superior para uma nova ampola de decantação de 250 mL. À fase aquosa adicionar mais 25 mL de éter de petróleo e repetir o procedimento. Recolher a fase superior para a nova ampola de decantação. Repetir novamente.

Na ampola de decantação com os extratos etéreos recolhidos, adicionar 4 porções de 20 mL de água, inverter e agitar suavemente, para evitar a formação de emulsões no mínimo. Ao retirar a tampa lava-la com poucos mL de éter de petróleo.

Transferir a fase superior para um balão de fundo redondo e boca esmerilada de 250 mL, através de um funil com o papel de filtro contendo 6 g de sulfato de sódio anidro. Lavar a ampola com poucos mL de éter de petróleo, bem como o papel de filtro.

Evaporar o extrato etéreo, no evaporador rotativo, a uma temperatura que não exceda os 40°C. Dissolver o resíduo da evaporação em metanol e transferir para um balão volumétrico de 25 mL e em seguida filtrar com um filtro de seringa (0,45 µm) diretamente para o vial.

As condições cromatográficas de trabalho para a determinação da Vitamina E são:

- Fase móvel: Metanol/Água Ultra Pura (95:5 v/v)
- Fluxo: 1,2 mL/min;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Temperatura do forno: 24°C;
- Comprimento de onda: 295 nm;
- Tempo de corrida: 20 minutos.

Resultados e observações:

De modo a verificar se esta metodologia seria adequada efetuaram-se diversos ensaios incidindo sempre sobre a mesma amostra cuja concentração de Vitamina E é conhecida:

- Valor rotulado: 2,33 mg/100g.
- Valor calculado por laboratório externo: $2,41 \pm 0,35$ mg/100g

O primeiro ensaio, designado de ensaio A, foi efetuado segundo o procedimento experimental acima referido, nas mesmas condições e no mesmo dia. Os ensaios A1, A2 e A3 são duplicados entre si e o ensaio A4 consiste na fortificação da amostra, na qual foram adicionados 1,25 mL da solução mãe (100,0 mg/L) logo após a pesagem da amostra no balão de 250 mL, sabendo que a fortificação é para uma concentração de 5,00 mg/L.

Tabela 4.1 Concentração da Vitamina E expressa em mg/L e mg/100g, correspondente aos primeiros ensaios realizados e respectivas percentagem de recuperação.

Ensaio	Concentração (mg/100g)	Concentração (mg/L)	Concentração média dos duplicados (mg/L)	% Recuperação	% Recuperação média
A1	1,32	5,32	5,55	38,2	33,6
A2	1,46	5,90		26,6	
A3	1,33	5,44		35,8	
A4 (Fortificado)	1,78	7,23	-	-	

Com a análise da tabela 4.1 pode-se verificar que os valores obtidos não são próximos dos valores de referência (2,33 mg/100g) e que as percentagens de recuperação dos diversos ensaios, em relação à amostra fortificada, são muito baixas.

Desta forma, com o intuito de melhorar o método analítico e tendo o mesmo procedimento experimental como base, foram realizados novos ensaios alterando diversos fatores, tais como:

- Saponificação em banho de água fervente;
- Duas extrações líquido-líquido;
- Solvente de extração: Éter Petróleo e Éter Etilico (70:30 v/v);
- Solvente de extração: n-Hexano;

Tabela 4.2 Novos ensaios efetuados com pequenas alterações no procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação.

Alteração efetuada	Ensaio	Concentração (mg/100g)	Concentração (mg/L)	Concentração média dos duplicados (mg/L)	% Recuperação	% Recuperação média
Saponificação em banho de água fervente	B1	1,28	5,27	5,44	62,0	58,6
	B2	1,38	5,61		55,2	
	B3 (Fortificado)	2,05	8,37	-	-	
Duas extrações líquido-líquido	C1	1,13	4,62	4,89	44,6	39,2
	C2	1,27	5,15		34,0	
	C3 (Fortificado)	1,69	6,85	-	-	
Solvente: 70%Éter Petróleo/ 30% Éter Dietílico	D1	1,79	7,23	7,07	75,2	78,4
	D2	1,71	6,90		81,8	
	D3 (Fortificado)	2,69	10,99	-	-	
Solvente: n-Hexano	E1	1,46	5,97	6,20	61,8	57,2
	E2	1,57	6,44		52,4	
	E3 (Fortificado)	2,20	9,06	-	-	

Com a análise da tabela 4.2, pode-se verificar que:

A realização de duas extrações líquido-líquido, não acrescentou melhorias significativas ao procedimento experimental, levando este ensaio para uma percentagem de recuperação média de 39,2%.

Já a saponificação em banho de água fervente melhorou um pouco mais o rendimento do método, com percentagem de recuperação média de 58,6%.

Nos ensaios D e E modificou-se o solvente de extração, para uma mistura de éter de petróleo com éter dietílico (70:30 v/v) e para o solvente n-hexano, respetivamente. Destes, a alteração que obteve melhor resultado foi a efetuada com o solvente composto por éter de petróleo e éter dietílico. A recuperação média deste ensaio é de 78,4%, valor este visivelmente superior aos 57,2% obtidos pelo ensaio E.

Sendo que o intuito da realização destes ensaios é melhorar o procedimento experimental e comparando a recuperação média do ensaio D, com os resultados dos restantes ensaios já realizados, as alterações efetuadas nos ensaios B, C e E são excluídas, não sendo, portanto, repetidas noutras circunstâncias.

Dada a eficácia da alteração efetuada no ensaio D, esta passará a ser permanente, ou seja, qualquer ensaio posterior ao ensaio E, será realizado com o solvente de extração composto por éter de petróleo e éter dietílico (70:30 v/v), no lugar do éter de petróleo, mencionado no protocolo acima.

Dado a contínua procura em melhorar o procedimento experimental e com o objetivo de aumentar a percentagem de recuperação média obtida, sem esquecer a utilização do novo solvente de extração, foram realizados mais dois ensaios:

- Ensaio F: Com o tempo de saponificação a aumentar para o dobro, passando a ser de uma hora.
- Ensaio G: Onde serão adicionados 1 mL da solução de ascorbato de sódio, ao invés dos 0,5 mL mencionados no procedimento experimental.

Tabela 4.3 Ensaios efetuados com a alteração do solvente e com outras pequenas alterações no procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação.

Alteração efetuada	Ensaios	Concentração (mg/100g)	Concentração (mg/L)	Concentração média dos duplicados (mg/L)	% Recuperação	% Recuperação média
1 hora de saponificação	F1	1,51	6,10	6,08	96,4	96,8
	F2	1,51	6,05		97,4	
	F3 (Fortificado)	2,71	10,92	-	-	
1 mL da solução de ascorbato de sódio	G1	1,52	6,11	6,18	65,4	64,0
	G2	1,55	6,24		62,8	
	G3 (Fortificado)	2,33	9,38	-	-	

Através da análise da tabela 4.3 é possível verificar que:

A realização de uma hora de saponificação apresenta significativas melhorias na percentagem de recuperação média, que aumentou de 78,4% para precisamente 96,8%. É notável o aumento de 18,4% de recuperação de vitamina E e tendo em conta que um ensaio apenas é considerado válido se a percentagem de recuperação relativamente à amostra fortificada for $100 \pm 20\%$, pode-se afirmar que o ensaio F é considerado válido.

Já o ensaio G, com a adição de 1 mL da solução de ascorbato de sódio não foi bem-sucedido, visto que de uma percentagem de recuperação média de 78,4% relativo ao ensaio D, baixou para os 64,0%, não sendo, portanto, considerado válido e desta forma, esta alteração será excluída e qualquer ensaio realizado depois deste não terá esta alteração incorporada no seu protocolo.

Dada a eficácia da alteração efetuada no ensaio F, esta passará a ser permanente, ou seja, qualquer ensaio posterior ao ensaio G, será realizado com o processo de saponificação de uma hora, no lugar dos 30 minutos mencionados no procedimento experimental.

De forma a comprovar e a assegurar que as alterações (solvente de extração composto por mistura de éter de petróleo com éter dietílico (70:30 v/v) e saponificação realizada durante uma hora), incorporadas no protocolo experimental são efetivas, um novo ensaio, desta vez de confirmação foi realizado.

Na tabela 4.4 é possível consultar os resultados.

Tabela 4.4 Ensaio de confirmação do novo procedimento experimental. Valores de concentração de Vitamina E, expressa em mg/L e mg/100g e respectivas percentagem de recuperação.

Ensaio	Concentração (mg/100g)	Concentração (mg/L)	Concentração média dos duplicados (mg/L)	% Recuperação	% Recuperação média
H1	1,60	6,48	6,55	96,6	95,2
H2	1,60	6,62		93,8	
H3 (Fortificado)	2,75	11,31	-	-	

Observando os resultados da tabela 4.4 e dado que um ensaio apenas é apenas considerado válido se a percentagem de recuperação média relativamente à amostra fortificada for $100 \pm 20\%$, pode-se afirmar que o ensaio H, isto é, a confirmação do ensaio F, é também válida e que as alterações efetuadas no protocolo experimental serão permanentes.

4.7 Procedimento experimental a validar

À luz das alterações efetuadas nos estudos preliminares deste método, o procedimento experimental a validar será o seguinte:

A um balão de 250 mL de fundo chato com boca esmerilada adicionar:

- 10 g da amostra preparada
- 40 mL etanol (95%) com agitação para dispersar a amostra
- 0,5 mL da solução de ascorbato de sódio e agitar
- 10 mL da solução de hidróxido de potássio e agitar
- Reguladores de ebulição

Colocar o balão esmerilado sob uma placa de aquecimento com um condensador de refluxo e deixar refluxar durante 1 hora.

- ✓ Preparar o solvente de extração: Adicionar a um balão volumétrico de 1 L, 700 mL de éter de petróleo e 300 mL de éter dietílico.

Transferir o conteúdo do balão para uma ampola de decantação de 250 mL. Para lavar o balão adicionar: 2 porções de 5 mL de etanol; 2 porções de 25 mL do solvente de extração e por último 50 mL de água. A cada lavagem transferir o conteúdo para a ampola de decantação.

Colocar a tampa na ampola de decantação, agitar vigorosamente durante 1 minuto e aliviar a pressão. Aguardar enquanto se forma a separação de fases, depois retirar a tampa e lava-la com poucos mL do solvente de extração.

Transferir a fase superior para uma nova ampola de decantação de 250 mL. À fase aquosa adicionar mais 25 mL do solvente de extração e repetir o procedimento. Recolher a fase superior para a nova ampola de decantação. Repetir novamente.

Na ampola de decantação com os extratos etéreos recolhidos, adicionar 4 porções de 20 mL de água, inverter e agitar suavemente, para evitar a formação de emulsões no mínimo. Ao retirar a tampa lava-la com poucos mL do solvente de extração.

Transferir a fase superior para um balão de fundo redondo e boca esmerilada de 250 mL, através de um funil com o papel de filtro contendo 6 g de sulfato de sódio anidro. Lavar a ampola com poucos mL do solvente de extração, bem como o papel de filtro.

Evaporar o extrato etéreo, no evaporador rotativo, a uma temperatura que não exceda os 40°C. Dissolver o resíduo da evaporação em metanol e transferir para um balão volumétrico de 25 mL e em seguida filtrar com um filtro de seringa (0,45 µm) diretamente para o vial.

As condições cromatográficas de trabalho para a determinação da Vitamina E são:

- Fase móvel: Metanol/Água Ultra Pura (95:5 v/v)
- Fluxo: 1,2 mL/min;
- Volume de injeção: 10 µL;
- Temperatura do forno: 24°C;
- Comprimento de onda: 295 nm;
- Tempo de corrida: 20 minutos.

5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros sistemáticos e/ou aleatórios, podendo assim, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Desta forma, torna-se fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (Relacre, 2000; Coordenação Geral de Acreditação, 2010).

Assim, o desenvolvimento, adaptação ou implementação de um método implica um processo de avaliação que permita assegurar que esse método possui as características adequadas para a obtenção de resultados com a qualidade requerida para determinada situação (Machado, 2011).

A validação de um método analítico tem de obedecer a um conjunto de requisitos mínimos, que compreendem o estudo e conhecimentos dos parâmetros seguintes (Relacre, 2010):

- Curva de calibração (gama de trabalho e linearidade)
- Limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação)
- Precisão (repetibilidade e precisão intermédia)
- Exatidão

O estudo destes parâmetros permite interpretar as informações, de modo a demonstrar que um método interno de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

No presente estudo, os parâmetros acima referidos serão avaliados segundo o guia Relacre nº13.

5.1 Curva de calibração

A curva de calibração em análises quantitativas diz respeito à relação existente entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito. Para o procedimento analítico, o analista prepara uma série de soluções padrão cuja concentração do parâmetro a dosear é conhecida. Estas são medidas no equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar e o instrumento irá gerar um sinal proporcional à concentração do analito estabelecendo-se um gráfico de calibração, permitindo, através de interpolação determinar a concentração de vitamina E nas amostras (Relacre, 2000).

Assim, para a construção de uma curva de calibração para a substância a analisar preparou-se a partir da solução padrão, uma solução-mãe com concentração de 100,0 mg/L, da qual se diluiu, posteriormente para a obtenção de padrões com concentração 5,00 mg/L, 10,00 mg/L, 20,00 mg/L, 30,00 mg/L, 40,00 mg/L e 50,00 mg/L.

Na figura seguinte é apresentado um cromatograma obtido para a solução padrão de 5,00 mg/L, onde é possível observar o sinal cromatográfico relativo ao composto em estudo, bem como o respetivo tempo de retenção.

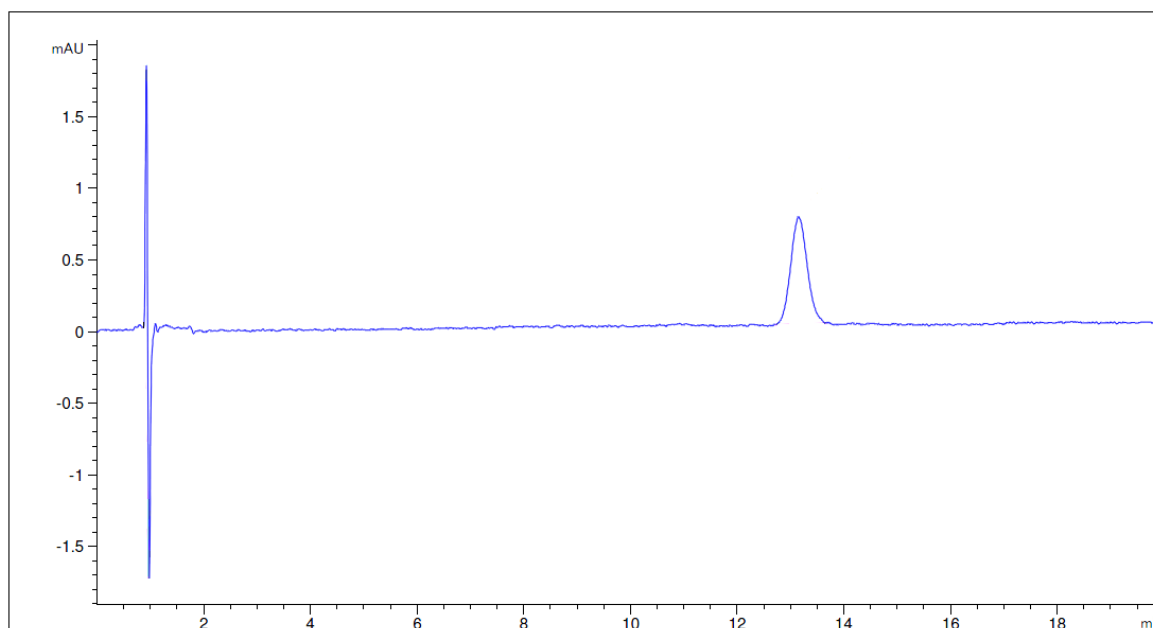


Figura 5.1 Cromatograma obtido para a solução padrão de 5,00 mg/L.

Na figura 5.2 é apresentado um gráfico com a sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra sem fortificação e amostra com fortificação de 5,00 mg/L, onde se evidencia o sinal cromatográfico perto do intervalo do tempo de retenção.

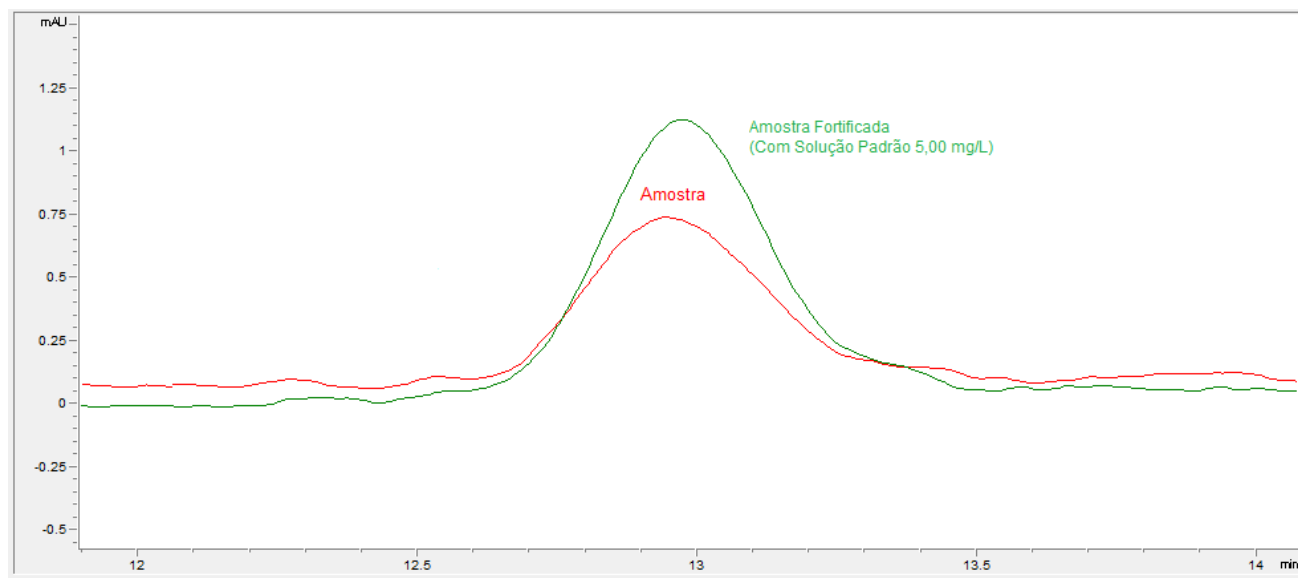


Figura 5.2 Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra sem fortificação e amostra com fortificação de 5,00 mg/L.

Na tabela 5.1 encontram-se os sinais cromatográficos referentes a cada concentração das soluções padrão e na figura 5.3 a representação gráfica referente à curva de calibração.

Tabela 5.1 Sinal cromatográfico referente à concentração dos padrões.

Concentração (mg/L)	Área do pico cromatográfico
5,00	15,89
10,00	31,45
20,00	63,50
30,00	91,70
40,00	121,0
50,00	153,2

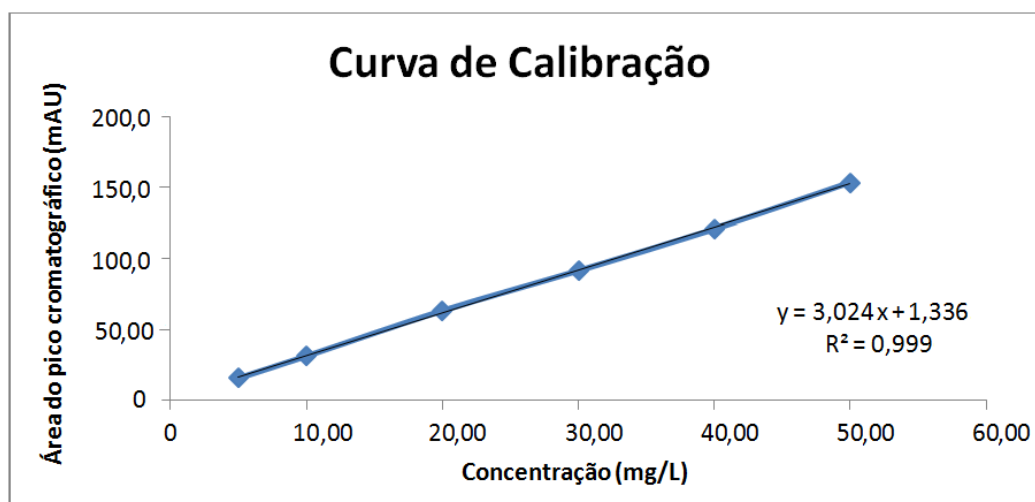


Figura 5.3 Representação gráfica referente à curva de calibração de vitamina E com padrões entre os 5,00 mg/L e os 50,00 mg/L.

O modelo de regressão linear é aceite quando o coeficiente de correlação linear é superior a 0,995. Na figura 5.3, é possível verificar que a equação $y = 3,024x + 1,336$ possui um coeficiente de correlação linear de 0,999 e desta forma, pode-se afirmar que este modelo de regressão linear é válido.

5.1.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método de ensaio define-se como sendo o intervalo entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta, para o qual se verifica ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio (INMETRO, 2003).

Segundo o Guia Relacre, quando uma metodologia envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias e para tal, são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações (Relacre, 2000).

Para efetuar o teste estatístico, o primeiro e o último padrão, 5,00 mg/L e 50,00 mg/L, são analisados em dez réplicas independentes, a partir das quais são calculadas as respetivas variâncias S^2_{50} e S^2_5 (Relacre, 2000).

$$S^2_{()} = \frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad \text{Equação (5.1)}$$

Sendo:

y_i – Valores de y (sinal instrumental);

\bar{y} – Média aritmética dos valores do sinal instrumental;

n – Número de repetições efetuadas.

As variâncias são testadas de modo a examinar as diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor do teste PG (valor experimental). Se se observar que $S^2_{50} > S^2_5$, então:

$$PG = \frac{S^2_{50}}{S^2_5} \quad \text{Equação (5.2)}$$

Para determinar se as diferenças de variâncias são, ou não, significativas, compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher a um nível de confiança de 99%, para n-1 graus de liberdade (n-1=9), que é de 5,35 (Relacre, 2000).

- Se $PG \leq F$ a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está ajustada.
- Se $PG > F$ a diferença de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser ajustada até que a diferença entre as variâncias relativas sejam aceites.

Tabela 5.2 Área dos picos cromatográficos referentes aos padrões 5,00 mg/L e 50,00 mg/L, bem como médias, desvios padrões, variâncias e valores experimentais de PG.

	Área dos picos cromatográficos	
	Padrão 5,00 mg/L	Padrão 50,00 mg/L
N=10	15,10	149,8
	15,97	150,7
	15,91	150,4
	16,05	151,4
	16,01	151,4
	15,80	151,0
	15,89	151,1
	15,44	150,3
	15,95	149,7
	15,88	150,1
Média	15,80	150,6
Desvio Padrão	0,30	0,6
Variância	0,09	0,39
Valor experimental PG	4,39	
Valor da distribuição F de Snedecor/Fisher	5,35	

Pela análise da tabela 5.2, é possível verificar que o valor experimental é inferior ao valor crítico PG < 5,35. Como tal, para este nível de confiança, a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está ajustada. Deste modo, verifica-se a homogeneidade de variância nos resultados obtidos.

5.1.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade do procedimento analítico, obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostra, dentro de uma determinada gama de trabalho (INMETRO, 2003).

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático (INMETRO, 2003). No entanto, este coeficiente apenas é bom indicador de correlação e não necessariamente de linearidade e, portanto, não comprova a linearidade da reta (Relacre, 2000).

O teste RIKILT é um teste complementar ao coeficiente de correlação, que permite analisar a linearidade em cada ponto da reta, de modo a garantir uma avaliação fiável. Para tal determina-se a razão entre cada sinal instrumental (Y_i) e a concentração respetiva (X_i). O valor médio calculado é considerado 100%, indicando assim a linearidade perfeita. Para admitir a linearidade do método, cada ponto de calibração deve estar situado entre os 90% e os 110% (Ferreira, 2013).

Tabela 5.3 Concentração do padrão e respetivo sinal instrumental. Cálculo das razões entre estes, bem como o seu valor médio e a percentagem de linearidade.

X_i	Y_i	Y_i/X_i	Valor médio (Y_i/X_i)	$\frac{Y_i/X_i}{\text{Valor médio } (Y_i/X_i)} \times 100\%$
5,00	15,9	3,18	3,11	102
10,00	31,5	3,15		101
20,00	63,5	3,18		102
30,00	91,7	3,06		98
40,00	121,0	3,03		97
50,00	153,2	3,06		98

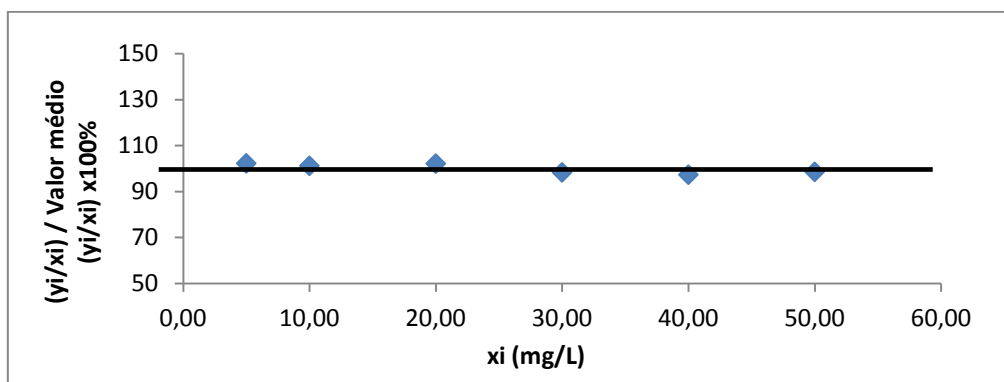


Figura 5.4 Teste RIKILT para avaliar a linearidade.

Através da tabela 5.3 e da figura 5.2, pode-se observar que cada ponto de calibração está situado entre os 90% e os 110%, respeitando as condições do teste RIKILT. Assim verifica-se a linearidade do método, sendo a função de calibração linear.

5.2 Limiares analíticos

Os limiares analíticos do método de ensaio consistem no limite de detecção e no limite de quantificação. Estes são parâmetros importantes pois indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar, respetivamente, a substância em análise (Relacre, 2000).

O limite de detecção (L.D.) é o teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, ou seja, este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra. De salientar que, uma leitura inferior ao limite de detecção, não significa a ausência de analito na amostra, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa é inferior a um determinado valor (Relacre, 2000; INMETRO, 2003).

Quando o método analítico envolve a utilização da calibração linear, o limite de detecção é calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, de acordo com a expressão:

$$L.D. = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação (5.3)}$$

Em que:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N - 2}} \quad \text{Equação (5.4)}$$

Onde:

3,3 – Valor de K, que é um fator numérico para um nível de confiança de 99,7%;

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da curva de calibração;

x_i – Valores de x (concentração dos padrões utilizados);

y_i – Valores de y (sinal instrumental);

a – Ordenada na origem da curva de calibração;

b – Declive da curva de calibração;

N – Número de padrões utilizados.

O limite de quantificação (L.Q.) corresponde à concentração mais baixa medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Normalmente corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado de modo a averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado, através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. O coeficiente de variação para estes padrões não deve exceder os 10% (Relacre, 2000; INMETRO, 2003).

O limite de quantificação é obtido por uma expressão idêntica ao limite de deteção, no entanto, valor de K=10 significa que o desvio padrão relativo é de 10%.

$$L. Q. = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação (5.5)}$$

Na tabela 5.4 encontram-se os limites de deteção e quantificação calculados através dos parâmetros da curva de calibração de regressão linear: $y = 3,024x + 1,336$.

Tabela 5.4 Valores dos limiares analíticos calculados.

Declive da reta b	Desvio Padrão Residual $S_{y/x}$	Limite de Deteção L.D.	Limite de Quantificação L.Q.
3,024	1,16	1,27 mg/L	3,84 mg/L

5.3 Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade e entre estas, existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia. Para a validação da metodologia em questão, somente os parâmetros de repetibilidade e precisão intermédia foram avaliados (Relacre, 2000; INMETRO, 2003).

A determinação da repetibilidade e da precisão intermédia é feita através da execução de n medições, usualmente $n \geq 10$ para a repetibilidade e $n \geq 15$ para a precisão intermédia, em condições pré-definidas (Relacre, 2000).

A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão (S) e pelo coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2003).

O desvio padrão da repetibilidade (S_{ri}) e o desvio padrão da precisão intermédia (S_{pi}), podem ser calculados a partir da expressão geral:

$$S_{()} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{x})^2} \quad \text{Equação (5.6)}$$

Em que:

n – Número de ensaios efetuados;

x_k – Resultado individual obtido;

\bar{x} – Média aritmética dos resultados individuais obtidos.

O coeficiente de variação da repetibilidade ($C.V._{ri}$) e o coeficiente de variação da precisão intermédia ($C.V._{pi}$), expresso em percentagem, podem ser calculados pela expressão:

$$C.V._{()} = \frac{S_{()}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (5.7)}$$

Em que:

$S_{()}$ – Desvio padrão;

\bar{x} – Média aritmética dos resultados individuais obtidos.

O método a validar considera-se preciso em termos de repetibilidade e precisão intermédia se os respetivos coeficientes de variação não excederem os 5,00%, valor máximo permitido pela legislação (Resolução-RE nº899 de 29 de Maio de 2003), que corresponde também ao critério interno exigido pela empresa para garantir a repetibilidade e/ou precisão intermédia do método.

5.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, ou seja, são efetuados ensaios sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possíveis, tais como, o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, num curto intervalo de tempo (Relacre, 2000).

Estes ensaios permitem calcular o limite de repetibilidade (r), que é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}), obtidos em condições de repetibilidade. Na prática, aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ (Relacre, 2000; INMETRO, 2003).

O limite de repetibilidade (r) é então obtido por:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad \text{Equação (5.8)}$$

Onde:

S_{ri} – Desvio padrão da repetibilidade.

Para determinar a repetibilidade é necessário efetuar 10 repetições (ou mais) do ensaio sobre a mesma amostra. O estudo da repetibilidade foi efetuado sobre uma amostra de manteiga com sal. Na tabela 5.5 encontram-se os valores necessários à avaliação deste parâmetro.

Tabela 5.5 Área dos picos cromatográficos e a respetiva concentração (expresso em mg/kg) para o estudo da repetibilidade.

	Área	Concentração (mg/kg)
N=10	15,25	14,44
	15,63	14,79
	14,68	13,92
	14,52	13,78
	14,72	13,96
	15,39	14,54
	15,51	14,65
	15,06	14,27
	15,90	15,04
	16,14	15,26
Média	15,28	14,47
Desvio Padrão	0,54	0,49
Limite de Repetibilidade (r)	1,51	1,37
Repetibilidade (%)	9,88	9,47
C.V.ri (%)	3,53	3,39

Como se pode verificar pela tabela anterior, o desvio padrão toma os valores de 0,54 e 0,49 para o sinal instrumental e concentração respetivamente e ambos os coeficientes de variação de repetibilidade são inferiores a 5,00%, mais precisamente 3,53% e 3,39% e como tal, pode-se considerar o método válido em termos de repetibilidade.

O limite de repetibilidade relativo ao sinal instrumental tem o valor de 1,51 e quanto à concentração toma o valor de 1,37. Isto é, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de repetibilidade, não deve exceder os valores de 1,51 unidades da área

do pico cromatográfico e de 1,37 unidades da concentração do analito, expresso em mg/kg. Assim, nas tabelas seguintes, são apresentadas as combinações das diferenças absolutas entre dois ensaios e o seu resultado.

Tabela 5.6 Diferença absoluta entre dois resultados dos ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para a área do pico cromatográfico. O limite de repetibilidade calculado tem o valor de 1,51.

	15,25	15,63	14,68	14,52	14,72	15,39	15,51	15,06	15,90	16,14
15,25	-									
15,63	0,38	-								
14,68	0,57	0,95	-							
14,52	0,73	1,10	0,16	-						
14,72	0,52	0,90	0,05	0,20	-					
15,39	0,14	0,24	0,71	0,87	0,66	-				
15,51	0,26	0,12	0,83	0,99	0,79	0,12	-			
15,06	0,18	0,56	0,39	0,54	0,34	0,33	0,45	-		
15,90	0,65	0,27	1,22	1,37	1,17	0,51	0,39	0,83	-	
16,14	0,89	0,51	1,46	1,61	1,41	0,75	0,63	1,07	0,24	-

Tabela 5.7 Diferença absoluta entre dois resultados dos ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para a concentração, expressa em mg/kg. O limite de repetibilidade calculado tem o valor de 1,37.

	14,44	14,79	13,92	13,78	13,96	14,54	14,65	14,27	15,04	15,26
14,44	-									
14,79	0,35	-								
13,92	0,52	0,87	-							
13,78	0,66	1,02	0,14	-						
13,96	0,48	0,84	0,04	0,18	-					
14,54	0,10	0,25	0,62	0,76	0,59	-				
14,65	0,21	0,15	0,73	0,87	0,69	0,11	-			
14,27	0,17	0,52	0,35	0,50	0,32	0,27	0,38	-		
15,04	0,60	0,25	1,12	1,26	1,08	0,50	0,39	0,77	-	
15,26	0,82	0,46	1,34	1,48	1,30	0,72	0,61	0,98	0,22	-

O limite de repetibilidade capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicadas de uma mesma amostra, determinada sob condições de repetibilidade é, ou não, significativa. Assim, através das tabelas 5.6 e 5.7, é possível verificar que as diferenças absolutas entre dois ensaios são inferiores aos respectivos limites de repetibilidade calculados anteriormente, com a exceção do valor marcado a vermelho, que representa a diferença absoluta entre o ensaio de valor mais alto e valor mais baixo, da gama de 10 ensaios efetuados, quer para a área do pico cromatográfico, quer para a concentração. De todas as combinações possíveis calculadas, ou seja de 45 diferenças absolutas possíveis para a área do pico cromatográfico e outras 45 para a concentração, apenas 1 diferença, em cada, é superior ao limite de repetibilidade, pode-se considerar que a diferença entre análises duplicadas de uma amostra, sob condições de repetibilidade não é significativa. E apoiando estes resultados num coeficiente de variação de repetibilidade que é inferior ao máximo permitido, então este ensaio é considerado válido em termos de repetibilidade.

5.3.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas com variações de determinadas condições, como por exemplo o dia, o analista ou o equipamento. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados de um laboratório (Relacre, 2000; INMETRO, 2003).

Para a determinação da precisão intermédia efetuaram-se 10 ensaios no mesmo dia, em condições de repetibilidade, usando a amostra de manteiga, de dez embalagens diferentes do mesmo lote. Na semana seguinte repetiu-se o ensaio com o mesmo analista, utilizando 5 das embalagens utilizadas anteriormente.

Na tabela seguinte estão apresentados os resultados:

Tabela 5.8 Área dos picos cromatográficos e a respetiva concentração (expresso em mg/L) para o estudo da precisão intermédia.

Amostra	Área	Concentração (mg/L)
1	15,25	5,78
2	15,63	5,92
3	14,68	5,57
4	14,52	5,51
5	14,72	5,59
6	15,39	5,83
7	15,51	5,88
8	15,06	5,71
9	15,90	6,02
10	16,14	6,11
1	15,29	5,87
2	15,84	6,06
3	14,70	5,67
4	15,70	6,01
5	15,38	5,90
Média	15,31	5,83
Desvio Padrão	0,50	0,19
C.V.pi (%)	3,27	3,26

Pela análise da tabela 5.8, para o estudo sobre a precisão intermédia, pode-se concluir que os coeficientes de variação, 3,27% e 3,26% para área do pico cromatográfico e concentração respetivamente, apresentam valores aceitáveis, uma vez o máximo permitido pela legislação e também o critério interno exigido pela empresa, tem o valor de 5,00%.

Assim, o método é considerado válido para a precisão intermédia.

5.4 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro. Este termo, quando aplicado a uma série de resultados de ensaios está dependente da combinação de componentes de erros aleatórios e erros sistemáticos. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência, a participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2003).

Para a validação da metodologia em questão, recorreu-se à realização de ensaios de recuperação. A recuperação do analito em estudo pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo. Estas podem ser fortificadas com o analito em diferentes concentrações, por exemplo, em baixa, média e alta concentração, de acordo com a gama de trabalho a que o método se aplica (INMETRO, 2003; Coordenação Geral de Acreditação, 2010).

O valor da recuperação da amostra é dado através da seguinte equação (INMETRO, 2003; Coordenação Geral de Acreditação, 2010):

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_R - C_A}{C_P} \times 100 \quad \text{Equação (5.9)}$$

Onde:

C_R – Concentração do analito na amostra fortificada;

C_A – Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_P – Concentração do padrão utilizado para fortificar a amostra.

Para a realização dos ensaios de recuperação, procedeu-se à preparação de 20 amostras de manteiga, das quais 10 são amostras fortificadas com o padrão mais baixo de 5,00 mg/L e outras 10 com o padrão de 40,00 mg/L.

Com base nos resultados obtidos nas tabelas 5.9 e 5.10, pode-se afirmar que os ensaios efetuados são válidos, tendo em conta que um ensaio apenas é considerado válido se a percentagem de recuperação relativamente à amostra fortificada for $100 \pm 20\%$ e as recuperações médias obtidas tanto para a gama baixa como para a gama alta de concentrações são superiores a 80%.

Tabela 5.9 Valores de recuperação obtidos para a fortificação com o padrão de 5,00 mg/L.

Amostra	Concentração obtida (mg/L)	Concentração do padrão utilizado (mg/L)	% Recuperação
NÃO FORTIFICADA	5,43	-	-
1	9,92	5,00	89,9
2	9,58		83,0
3	9,58		83,0
4	9,98		91,0
5	9,67		84,8
6	9,82		87,8
7	9,65		84,4
8	9,72		85,8
9	10,28		97,0
10	10,29		97,2
Média			88,4
Desvio Padrão			5,3
C.V. (%)			6,00

Tabela 5.10 Valores de recuperação obtidos para a fortificação com o padrão de 40,00 mg/L.

Amostra	Concentração obtida (mg/L)	Concentração do padrão utilizado (mg/L)	% Recuperação
NÃO FORTIFICADA	4,64	-	-
1	38,33	40,00	84,2
2	37,35		81,8
3	36,79		80,4
4	37,12		81,2
5	37,18		81,4
6	36,77		80,3
7	37,50		82,2
8	33,89		73,1
9	33,78		72,9
10	34,20		73,9
Média*			81,6
Desvio Padrão*			1,3
C.V. (%)*			1,60

*Média, Desvio Padrão e C.V. calculados para as amostras 1 a 7. Os valores das amostras 8, 9 e 10 foram rejeitados.

6. CONCLUSÃO

Concluindo, verifica-se que a elaboração deste trabalho acerca da implementação e validação de um método de pesquisa e quantificação de vitamina E por cromatografia líquida de alta eficiência é de extrema importância em termos de controlo alimentar, devido à sua aplicação como antioxidante nos alimentos e devido às recentes descobertas dos seus efeitos benéficos para a saúde.

Para a validação deste método foi necessário recorrer a estudos preliminares, de forma a obter um método simples e fiável para ser utilizado como método em análises de rotina. Assim, após o estabelecimento do método adequado procedeu-se à sua validação.

Relativamente ao método implementado verificou-se que:

A concentração de padrões conhecidos correlaciona-se linearmente com a resposta das respetivas áreas do pico cromatográfico, dada a proximidade do coeficiente de correlação à unidade.

A linearidade foi verificada entre as concentrações de 5,00 mg/L e 50,00 mg/L sendo que, qualquer valor fora desta gama trata-se de extrapolação. De modo a evitar incertezas associadas à medição aquando da utilização de concentrações fora da gama linear, deve-se proceder à diluição da amostra para concentrações superiores a 50,00 mg/L ou pesar-se uma quantidade maior de amostra na preparação da mesma para concentrações inferiores a 5,00 mg/L.

O método possui um limite de deteção de 1,27 mg/L e um limite de quantificação de 3,84 mg/L.

Em termos de repetibilidade, a metodologia encontra-se validada uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 5,00%. Tendo em conta este estudo de repetibilidade, também se determinou o limite de repetibilidade deste método 1,37 mg/kg, ou seja, esta é a diferença máxima entre dois duplicados em condições de repetibilidade.

Numa análise de precisão intermédia, fazendo variar apenas os dias em que se realizaram as análises, verifica-se um desvio padrão de precisão intermédia de 0,19 mg/L e um coeficiente de variação de 3,26%. Este valor é aceite para a variabilidade dos resultados deste método, uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 5,00%.

Para a avaliação da exatidão do método, recorreu-se à realização de ensaios de recuperação, tendo-se fortificado a amostra com o padrão de 5,00 mg/L e 40,00 mg/L. Uma vez que internamente o critério de aceitação é entre 80% e 120% de recuperação, confirmou-se assim a exatidão do método.

Após o cumprimento de todos os requisitos de cada etapa da validação, o método considera-se validado. A importância da validação rege-se no facto de esta ser fundamental para definir se os métodos desenvolvidos se adequam aos objetivos a que se destinam, a fim de obter dados confiáveis que possam ser satisfatoriamente analisados.

Conclui-se, assim, que é indispensável que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Neste caso específico, verifica-se que este método permite a obtenção de resultados confiáveis para a determinação de vitamina E em amostras de manteiga. O método analítico passou assim a fazer parte dos recursos do laboratório de química da empresa SGS.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aditivos e Ingredientes (2010) A Vitamina E Tocoferóis e Tocotrienóis. http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/189.pdf. Acedido 1 Março 2013
- Agilent Technologies (2013) HPLC Basics: Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC). http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf. Acedido 16 Março 2014
- Almeida M (2013) Bioquímica do Envelhecimento. http://envelhecimento93.blogspot.com/2011_05_01_archive.html. Acedido 10 Outubro 2013
- Almenar E, Samsudin H, Auras R, Harte J (2010) Consumer acceptance of fresh blue berries in bio-based packages. *J Sci Food Agri* 90:1121-1128
- Alvarenga G (2013) A importância dos nutrientes para uma vida saudável. http://www.foreverliving.com.br/arqs/downloads/detalhe_1224594990_flp_cartilha_nutricao_20071214_web.pdf. Acedido 1 Março 2014
- Anderson D (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 350:103-108
- Andreo D, Jorge N (2006) Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *B.CEPPA* 24:319-336
- Azzi A, Stocker A (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res* 39:231-255
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* 377:1019-1031
- Barreiros ALBS, David JM, David JP (2006) Estresse oxidativo: relação entre espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29:113-123
- Batista ES, Costa AGV, Sant'Ana HM (2007) Adição da Vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev Nutr* 20:525-535
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer I (2008) Bioquímica, 6ªEd. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 746-752
- Berger S (2013) Kazimierz (Casimir) Funk - Pioneer in Vitaminology - 101 Anniversary of His Discovery - Special Note. *Pol J Food Nutr Sci* 63:201-205
- Bianchi MLP, Antunes LMG (1999) Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 12:123-130

- Bianchini R, Penteadó MVC (2003) Vitamina E. Em: Penteadó MVC (Ed) Vitaminas - Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Manole, Barueri, pp 23-164
- Blennow K, De Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403
- Boni A, Pugliese C, Cláudio CC, Patin RV, Oliveira FL (2010) Vitaminas antioxidantes e prevenção da arteriosclerose na infância. *Rev Paul Pediatr* 28:373-380
- Botterweck AAM, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J (2000) Intake of butylatedhydroxyanisole and butylatedhydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem Toxicol* 38:599-605
- Bouhlal S, Issanchou S, Nicklaus S (2011) The impact of salt, fat and sugar levels on toddler food intake. *Br J Nutr* 105:645-653
- Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J* 13:1145-1155
- Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr* 76:703-716
- Buck DF (1981) Antioxidants in soy oil. *J Am Oil Chem Soc* 58:275-278
- Burcham PC (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role information of endogenous DNA adducts. *Mutagen* 13:287-305
- Burri BJ (2007) Analysis of Vitamin E by HPLC. Em Preddy VR, Watson RR (Eds) *The Encyclopedia of Vitamin E*, 1ªEd. CABI Publishing, Trowbridge, pp 172-181
- Burns A, Iliffe S (2009) Dementia. *BMJ* 338:405-409
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU (1983) Is vitamin E the only lipid-soluble chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 221:281-290
- Cardoso BR, Cozzolino SMF (2009) Oxidative stress in Alzheimer's disease: the role of vitamins C and E. *Nutrire Rev Soc Bras Alim Nutr* 34:249-259
- Choe E, Min DB (2007) Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *J Food Sci* 72:77-86
- Christie WW (2014) Tocopherols and tocotrienol - structure, composition, biology and analysis. AOCs Lipids Library. <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/tocol/index.htm>. Acedido 27 Fevereiro 2014
- Codex Alimentarius Commission (2014a) GSFA Online: Food Additive Details BHT. <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=189>. Acedido 07 Julho 2014

- Codex Alimentarius Commission (2014b) GSFA Online: Food Additive Details TBHQ. <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=190>. Acedido 07 Julho 2014
- Codex Alimentarius Commission (2014c) GSFA Online: Food Additive Details BHA. <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=186>. Acedido 07 Julho 2014
- Combs GF (2008) Discovery of the vitamins. Em: The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health, 3ªEd. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 16
- Coordenação geral de acreditação (2010) Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 03 – FEV/2010
- Costa SMCL (2008) Importância das vitaminas, antioxidantes e ômega-3 na Doença de Alzheimer. Monografia, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto
- Cruz VT, Pais J, Teixeira A, Nunes B (2004) Sintomas iniciais de demência de Alzheimer: a percepção dos familiares. Acta Med Port 17:437-444
- Degani AL, Cass QB, Vieira PC (1998) Cromatografia: um breve ensaio. QNEsc 7:21-25
- Dersjant LY, Jensen SK, Bos LW, Peisker MR (2009) Bio-discrimination of alpha-tocopherol stereoisomers in rearing and veal calves fed milk replacer supplemented with all-rac-alpha-tocopheryl acetate. Int J Vitamin Nutr Res 79:199-211
- Doroshov JH (1983). Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. Cancer Res 43:460-472
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 82:47-95
- Eckert CR (2006) Determinação da actividade anti-radicalar de flavonoides e extratos de espécies de Baccharis através da reação quimioluminescente do luminol. Dissertação, Instituto de Química, Universidade de São Paulo
- Erickson MC (2002) Lipid Oxidation of Muscle Foods. Em: Akoh CC, Min DB (Eds) Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, 2ªEd. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 401-402
- Evans HM, Bishop BKS (1922) Fetal resorption. Sci 55:650
- Evans HM, Emerson OH, Emerson GA (1936) The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamina E. J Biol Chem 113:319-332
- Ferreira AS (2013) Validação da determinação de teobromina em amostras de cacau e seus derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Dissertação para obtenção

de Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Food Ingredients Brasil (2009) Os Antioxidantes. <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>.
Acedido 1 Março 2014

Frankel EN (1980) Lipid Oxidation. Prog Lip Res 19:1-22

Gava AA, Zanoni JN (2005) Envelhecimento celular. Arq Ciênc Saúde Unipar 9:41-46

Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre M.C, López-Sabater MC (2000a) Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 88:251-254

Gimeno E, Calero E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre M.C, López-Sabater MC (2000b) Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 881:255-259

Grabowski TJ, Damasio AR (1998) Dementias. Em: Rosenberg RN (Ed) Atlas of clinical neurology, 1ªEd. Current Medicine, Philadelphia, pp 6.1-6.28

Halliwell B, Cross C, Gutteridge J (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med 119:598-620

Halliwell B, Aeschbach R, Löllinger J, Aruoma OI (1995) The characterization on antioxidants. Food Chem Toxicol 33:601-617

Halliwell B (2001) Free radicals and other reactive species in disease. Em: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, pp 1-7

Hickman KCD (1944) Purification of sludges, scums and the like to prepare relatively purified tocopherol. United States Patent Office, 2 349 270

Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997) Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. FEBS Lett 409:105-108

Indyk HE (1988) Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. Analyst 113:1217-1221

INMETRO (2003) Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 01-MARÇO/2003. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

INSA (2007) Tabela da Composição dos Alimentos. http://www.musculacao.net/wp-content/uploads/2012/10/tabela_alimentos.pdf. Acedido 1 Março 2014

- ISO 6867:2000. Animal feeding stuffs - determination of vitamin e content - method using high-performance liquid chromatography
- Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL (1996) Lipid oxidation in biological and food systems. Em Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK (Eds) Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 5-63
- Jellinger KA (2006) Alzheimer 100: Highlights in the history of Alzheimer research. J Neural Transmission 113:1603-1623
- Kaliora AC, Dedoussis GV (2007) Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. Pharmacol Res 56:99-109
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. Nat Rev Drug Discov 10:698-712
- Kiyose C, Muramatsu R, Kameyama Y, Ueda T, Igarashi O (1997) Biodiscrimination of alpha-tocopherol stereoisomers in humans after oral administration. Am J Clin Nutr 65:785-789
- Kupiec T (2004) Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography. Int J Pharm Compd 8:223-227
- Lidon F, Silvestre M (2010) Princípios de Alimentação e Nutrição Humana. Escolar Editora, Lisboa, pp 181-190
- Lim H, Woo S, Kim HS, Jong SK, Lee J (2007) Comparison of extraction methods for determining tocopherols in soybeans. Eur J Lipid Sci Technol 109:1124-1127
- Machado ACCCR (2011) Implementação de um método para a determinação de hidrocarbonetos alifáticos saturados em óleo de girassol por cromatografia gasosa. Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa
- Madhavi DL, Singhal RS, Kulkarni PR (1996) Technological aspects of food antioxidants. Em: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK (Eds) Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 159
- Manton KG, Volovik S, Kulminski A (2004) ROS effects on neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders: on environmental stresses of ionizing radiation. Curr Alzheimer Res 1:227-293
- Meydani M (2000) Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. Am J Clin Nutr 71:1665-1668

- Monteiro VCB (2007) Avaliação do estresse oxidativo em humanos e em animais suplementados com ácidos graxos polinsaturados ômega-3. Dissertação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
- Mourão DM, Sales NS, Coelho SB, Pinheiro-Santana HM (2005) Biodisponibilidade de vitaminas lipossolúveis. *Rev Nutr* 18:529-539
- Namiki M (1990) Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 29:273-300
- Nelson DL, Cox MM (2005) *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 4ªEd. Worth Publishers, New York, pp 820-822
- Nimalaratne C, Lopes-Lutz D, Schieber A, Wu J (2011) Free aromatic amino acids in egg yolk show antioxidant properties. *Food Chem* 129:155-161
- Norberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thiolredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287-1312
- Odin AP (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat Res* 386:39-67
- Olszewer E (1995) *Radicais livres em medicina*. Fundo Editorial Byk-Prociencx, São Paulo, pp 204-208
- Ordóñez JA (2005) *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Artmed, Porto Alegre, pp 33-49
- Paiva SAR, Russell RM (1999) β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* 18:426-433
- Paixão JA, Stamford TLM (2004) Vitaminas lipossolúveis em alimentos – uma abordagem analítica. *Quim Nova* 27:96-105
- Pallett KE, Young AJ (1993) Carotenoids. Em: Alscher RG, Hess JL (Eds) *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp 59
- Panfili G, Manzi P, Pizzoferrato L (1994) High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in italian cheeses. *Analyst* 119:1161-1165
- Panfili G, Fratianni A, Irano M (2003) Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J Agric Food Chem* 51:3940-3944
- Pereira MOS (2010) Estudo comparativo de métodos de avaliação da capacidade antioxidante de compostos bioativos. Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Pereira R (2011) Importância Alimentar das Vitaminas. <http://www.atividaderural.com.br/artigos/4ec64d31b02c1.pdf>. Acedido 1 Março 2014
- Pinto AM (2007) Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações. Lidel - Edições Técnicas, pp 469-470
- Polidori MC, Sies H, Stahl W, Flohé RB (2007) Vitamin E, metabolism and biological activity of metabolic products. Em: Preddy VR, Watson RR (Eds) The Encyclopedia of Vitamin E. CABI Publishing, Trowbridge, pp 11-14
- Quek SY, Chu BS, Baharin BS (2007) Commercial extraction of vitamin E from food sources. . Em: Preddy VR, Watson RR (Eds) The Encyclopedia of Vitamin E. CABI Publishing, Trowbridge, pp 141-151
- Rachieru D, Duca R, Olteanu M (2009) Validation of a method to determine vitamin E (alpha tocopherol) from feed ingredients by HPLC using reverse phase chromatography. Universitatea de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Iaşi, Lucrări Ştiinţifice, 52:543-547
- Ramalho VC, Jorge N (2006) Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Quim Nova 29:755-760
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR (2002) Antioxidants. Em: Akoh CC, Min DB (Eds) Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology, 2ªEd. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 507-534
- Relacre (2000) Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, pp 1-30
- Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acedido 06 Maio 2014
- Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C (2007) Vitamin E and neurodegenerative diseases. Mol Aspects Med 28:501-606
- Salo-Väänänen PS, Ollilainen V, Mattila P, Lehtikainen K, Salmela-Mölsä E, Piironen V (2000) Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. Food Chem 71:535-543
- Schwartz H, Ollilainen V, Piironen V, Lampi AM (2008) Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. J Food Comp Anal 21:152-161
- Scotti L, Scotti MT, Cardoso C, Pauletti P, Castro-Gamboa I, Bolzani VS, Velasco MVR, Menezes CMS, Ferreira EI (2007) Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de

- moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Rev Bras Ciênc Farm* 43:153-166
- Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:67-103
- Shahidi F, Wanasundara UN (2002) Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. Em: Akoh CC, Min DB (Eds) *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 2ªEd. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 483-484
- Shahidi F, Zhong Y (2005) Antioxidants: Regulatory Status. Em: Shahidi F (Ed) *Bailey's Industrial Oil And Fat Products*, 6ªEd. Wiley-Interscience, Hoboken, pp 492-498
- Sharma G, Muller DP, O'Riordan SM, Bryan S, Dattani MT, Hindmarsh PC, Mills K (2013) Urinary conjugated α -tocopheronolactone - a biomarker of oxidative stress in children with type 1 diabetes. *Free Radic Biol Med* 55:54-62
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem* 215:213-219
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62:1315-1321
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (2006) Cromatografia líquida de alta eficiência. Em: *Fundamentos de Química Analítica*, 8ªEd. Thomson, São Paulo, pp 924-944
- Slavin M, Yu L (2012) A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. *Food Chem* 135:2789-2795
- Soares SE (2002) Phenolic acids as antioxidants. *Rev Nutr* 15:71-81
- Swiglo AG, Sikorska E (2004) Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J Chromatogr A* 1048:195-198
- Talvas J, Caris-Veyrat C, Guy L, Rambeau M, Lyan B, Minet-Quinard R, Lobaccaro JMA, Vasson MP, Georgé S, Mazur A, Rock E (2010) Differential effects of lycopene consumed in tomato paste and lycopene in the form of a purified extract on target genes of cancer prostatic cells. *Am J Clin Nutr* 91:1716-1724
- Traber MG, Arai H (1999) Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu Rev Nutr* 19:343-355
- Van Der Beek EM, Kamphuis P (2008) The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease. *Eur J Pharmacol* 585:197-207
- Vieira R (2003) *Fundamentos de Bioquímica*. Rideel, Belém-Pará, pp 86
- Wang X, Quinn PJ (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38:309-336

- Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 23:209- 240
- Weimann BJ, Weiser H (1991) Functions of vitamin E in reproduction and in prostacyclin and immunoglobulin synthesis in rats. *Am J Clin Nutr* 53:1056-1060
- Weiser H, Vecchi M (1982) Stereoisomers of α -tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption/gestation tests. *Int J Vitam Nutr Res* 52:351-370
- Weiser H, Riss G, Kormann AW (1996) Biodiscrimination of the eight α -tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2*R*forms in tissues and plasma of rats. *J Nutr* 126:2539–2549
- Weston A, Brown PR (1997) HPLC and CE principles and practice. Academic Press, London, pp 1-20
- Würtzen G (1990) Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chem Toxicol* 28:743-745
- Yaari R, Corey-Bloom J (2007) Alzheimer's disease. *Semin Neurol* 27:32-41
- Ying W (1996) Deleterious network hypothesis of Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 46:421-428
- Yu TW, Anderson D (1997) Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat Res* 37:201-210